

Cavidades desarrolladas en rocas magmáticas: troglobios y alteración de la roca. Aplicaciones a la vida extraterrestre.

Laura González-López

Tesis doctoral UDC / 2018

Director/a: Juan Ramón Vidal Romaní

Tutor/a: Soledad Muniategui Lorenzo

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología ambiental (DR 99/2011)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



O Profesor Emérito Dr. Juan Ramón Vidal Romaní

CERTIFICA

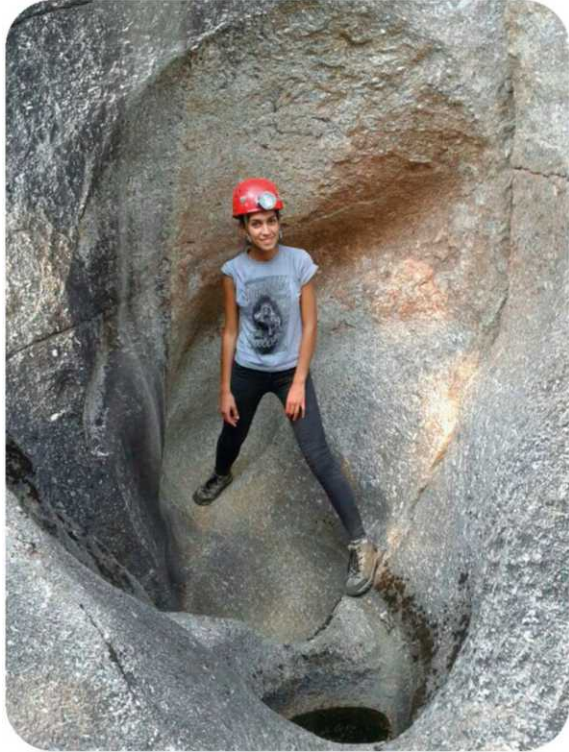
Que o traballo de investigación orixinal titulado:
CAVIDADES DESARROLLADAS EN ROCAS MAGMÁTICAS:
TROGLOBIOS Y ALTERACIÓN DE LA ROCA. APLICACIONES A
LA VIDA EXTRATERRESTRE.

foi realizado por Dona Laura González López, e que como director do
mesmo autoriza a súa presentación como memoria de Tese Doutoral con
obxecto de que sexa xulgada polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expido e asino o presente documento na cidade
da Coruña o 11 de decembro de 2017.

Asdo. Juan Ramón Vidal Romaní
Director da Tese de Dotoramento

Asdo Soledad Muniategui Lorenzo
Tutora da Tese de Dotoramento



Alice opened the door and found that it led into a small passage, not much larger than a rat-hole: she knelt down and looked along the passage into the loveliest garden you ever saw.

Alice's Adventures in Wonderland, Lewis Carroll

A todos vosotr@s

No hay nada como las relaciones. En el universo, cada cosa está relacionada con todas las demás. Nada existe de forma aislada. No podemos pensar que somos individuos que pueden hacerse a sí mismos sin ayuda de nadie.

Margaret Wheatley

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento a mi director, el Profesor Emérito de la Universidad de Coruña, Dr. Juan Ramón Vidal Romaní, por haberme ofrecido la posibilidad de desarrollar este trabajo de Tesis en un campo tan interesante como desconocido y, sobre todo, compartir conmigo de forma ilimitada su gran conocimiento, consejos y tiempo durante todos estos años. Como decía Bernardo de Chartes (Metalogicon, 1159, III,4).

Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos, gigantium humeris incidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvenimur et extollimur magnitudine gigantea

Es por esto que para mi ha sido un privilegio haber contado con un Director de tesis de tan amplia experiencia y conocimiento en el tema. A Juan Ramón Vidal Romaní debo también su generosa oferta para utilizar en mi trabajo su banco de muestras recogidas por él en cuevas graníticas de todo el Mundo durante mas de 30 años de investigación. También quiero agradecer a los compañeros y profesores del Instituto Universitario de Xeoloxía (IUX) por su apoyo durante mi estancia en el Centro de trabajo. Igualmente agradezco al Dr. Marcos Vaqueiro y Reinaldo del Club de Espeleoloxía A Trapa (CETRA), por su ayuda en mi breve experiencia en el mundo subterráneo de las cuevas graníticas de Galicia.

También quisiera mostrar mi reconocimiento a otros destacados investigadores: Dr. Pedro M. Sánchez, Dra. Silvia Sabariego, Dra. M. Graciela Estévez, Dr. Rafael Jordana, Dr. Edward A. D. Mitchell y Dr. Enrique Lara, quienes, de forma desinteresada, me han prestado su ayuda en diferentes cuestiones relacionadas con sus respectivas especialidades; así como a Dra. Natuscha N. Lee por haberme acogido brevemente en el Department of Microbiology (Technische Universität München). Gracias también a Dra. María J. López por compartir conmigo sus experiencias en un tema similar al de mi Tesis ; a Dra. Ana Ulla y Begoña Anta, mentoras del curso GRADschool, por sus consejos y motivación, y a mis compañeros, así como a la Fundación Barrié por la oportunidad prestada.

“...Tengo que acabar la tesis”. No. Ya no lo volveréis a escuchar más... (Espero que escuchéis otra... ya conocéis mi incansable curiosidad científica ☺)

A mi zipi, Yasmina y Lucía Palleiro porque se lo mucho que os alegráis de que esto haya llegado a su fin. Mil gracias por estar ahí, por escucharme, por aguantarme y levantarme. A todas las personas de las que he absorbido consejos, motivación, experiencias, conocimiento y con las que tomarse un respiro siempre es necesario: Omar, Ana Piñeiro, Efrén, Dra. Paula Carpintero, Dra. Raquel Gago, Lucía, Charlotte, Roberto, Migui, Bitá, Nati, Iria, Alba, Bei, Manu, Ave, Adriana, Adri, David, Dani, Juanjo, Ebaes y compañeros de cursos y congresos. A mis compañer@s del INTA (Dra. Paloma Lorenzo, Gabriel, Dra. Inés Peraile, Dra. M. Valle Jiménez, Dra. Matilde Gil, Tcol. J. C. Cabria y demás), y a mis compañeros becarios (sobre todo, Sofía, Álvaro y Mario) no solo por ser unos excelentes investigadores, sino por ayudarme día a día para seguir trabajando duro. A Paloma, mi tutora, mil gracias por haberme dado la oportunidad de completar mi formación en Madrid y ayudarme con todo lo que está en su mano. A mis compañeras de piso, que han sido y son mi familia en Madrid (Cris, Alba, Lucía y Ana). A todos vosotros que sí habéis sabido lo mucho que he trabajado para llegar a esto, no tengo más que daros las gracias por el apoyo constante y comprensión ante mis ausencias. Gracias por seguir ahí.

También cabe destacar mi gratitud a mis jefas, Ana de Decathlon y María de Cuplé, que me han dado todas las facilidades para compaginar estudios y trabajo a lo largo de todos estos años. Así como al resto de personas que han pasado por mi vida y me han alentado e inspirado con cualquier hecho o consejo. Por todo lo anterior y mucho más, gracias a mi familia, y sobre todo a mi madre, con quien tantas tardes pasé en la biblioteca durante mi infancia haciendo los deberes, por darme todas las facilidades para mi desarrollo académico y por inculcarme la cultura del esfuerzo y dedicación.

Resumen

CAVIDADES DESARROLLADAS EN ROCAS MAGMÁTICAS: TROGLOBIOS Y ALTERACIÓN DE LA ROCA. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA VIDA EN AMBIENTES EXTRATERRESTRES

Pese a la gran existencia de estudios sobre geobiología en ecosistemas subterráneos cársticos, no existe un estudio similar en los equivalentes en rocas magmáticas plutónicas (granitos). En un principio, los espeleotemas asociados a cavidades de rocas magmáticas fueron estudiados desde un punto de vista químico. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a estudiar su relación con los microorganismos troglobios que se desarrollan en las cuevas.

Este trabajo ha permitido demostrar que los sistemas subterráneos de rocas graníticas, pese a ser ambientes oligotrofos, albergan ecosistemas únicos que perduran en el tiempo y el espacio, independientemente de la región climática y geográfica; y cuyo biotopo contribuye activamente a la formación de estos depósitos. Se ha descrito el proceso de génesis de estos bioespeleotemas y se han identificado mediante secuenciación masiva, los microorganismos que contribuyen a su desarrollo. Así como se han identificado los diferentes minerales de los que están compuestos y descrito su proceso de formación; biótico en el caso del ópalo A, biomineral del que están compuestos mayormente estos depósitos y que ha permitido descubrir la íntima relación existente, en estos ambientes, entre las bacterias y el silicio.

Resumo

CAVIDADES DESENVOLVIDAS EN ROCHAS MAGMÁTICAS: TROGLOBIOS E ALTERACIÓN DA ROCHA. APLICACIÓN AO ESTUDO DA VIDA EN AMBIENTES EXTRATERRESTRES

A pesar da gran existencia de estudos sobre geobioloxía en ecosistemas subterráneos cársticos, non existe un estudo similar nos equivalentes en rochas magmáticas plutónicas (granitos). Nun principio, os espeleotemas asociados a cavidades de rochas magmáticas foron estudados desde un punto de vista químico. Con todo, recentemente comezouse a estudar a súa relación cos microorganismos troglobios que se desenvolven nas covas.

Este traballo permitiu demostrar que os sistemas subterráneos de rochas graníticas, a pesar de ser ambientes oligotrofos, albergan ecosistemas únicos que perduran no tempo e o espazo, independentemente da rexión climática e xeográfica; e cuxo biotopo contribúe activamente á formación destes depósitos. Describiuse o proceso de xénese destes bioespeleotemas e identificáronse mediante secuenciación masiva, os microorganismos que contribúen ao seu desenvolvemento. Así como identificáronse os diferentes minerais dos que están compostos e foi descrito o seu proceso de formación; biótico no caso do ópalo A, biomineral do que están compostos maiormente estes depósitos e que permitiu descubrir a íntima relación existente, nestes ambientes, entre as bacterias e o silicio.

Abstract

CAVES DEVELOPED IN MAGMATIC ROCKS. TROGLOBITES AND ROCK WEATHERING. IMPLICATIONS FOR LIFE DETECTION ON OTHER PLANETS

In spite of the great existence of studies on geobiology in karst underground ecosystems, there is no similar study on the equivalents in plutonic magmatic rocks (granites). At first, the speleothems associated with rock cavities were studied from a chemical point of view. However, recently there has been studies about the relationship with the microorganisms that develop in the caves.

This work has demonstrated that the underground systems of granitic rocks, despite being oligotrophic environments, harbor unique ecosystems that persist in time and space, regardless of the climatic and geographical region; and whose biotope contributes actively to the formation of these deposits. The process of genesis of these biospeleothems has been described and the microorganisms that help to its development have been identified through mass sequencing. Besides, we have identified the different minerals of which they are composed and described their formation process; biotic in the case of the opal A. Which is the biomineral that these deposits are mainly composed. This finally has allowed us to discover the intimate relation existing, in these environments, between the bacteria and the silicon.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
1.1. INTRODUCCIÓN	9
1.2. OBJETIVOS	10
1.3. INTERÉS DEL TRABAJO	10
2. ANTECEDENTES	15
2.1. LAS ROCAS MAGMÁTICAS	15
2.1.1. Introducción.....	15
2.1.2. Tipos de cuevas	17
2.2. ESPELEOTEMAS.....	18
2.2.1. Primeros estudios.....	18
2.2.2. Estado actual del conocimiento.....	19
2.2.2.1. En cuevas de calizas.....	19
2.2.2.2. En tubos volcánicos.....	20
2.2.2.3. En cuevas de rocas magmáticas.....	22
2.2.2.3.1. Evolución de la clasificación de espeleotemas	23
2.2.2.4. En otras cuevas	25
2.3. MINERALES	26
2.3.1. Introducción.....	26
2.3.1.1. Minerales heredados	27
2.3.1.2. Minerales autigénicos.....	27
2.3.1.3. Minerales autigénicos amorfos	27
2.3.1.4. Minerales autigénicos cristalinos	28
2.3.1.4.1. Microcristales y lepisferas de Yeso ($\text{SO}_4\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	28
2.3.1.4.2. Microcristales de Calcita CaCO_3	29
2.3.2. Formación del ópalo amorfo biogénico	29
2.3.3. Textura y estructura	32
2.4. ORGANISMOS	32
2.4.1. Introducción.....	32

2.4.2.	Bacterias	34
2.4.2.1.	El rol de las bacterias en geomicrobiología	34
2.4.2.1.1.	Introducción.....	34
2.4.2.1.2.	Las bacterias quimiolitotóxicas y las EPS	36
2.4.3.	Amebas testáceas.....	37
2.4.4.	Diatomeas	39
2.4.5.	Artrópodos.....	39
2.4.6.	Polen	41
3.	METODOLOGÍA.....	57
3.1.	TRABAJO BIBLIOGRÁFICO	57
3.2.	TRABAJO DE CAMPO	57
3.2.1.	Cuevas	57
3.2.1.1.	Áreas a estudio.....	57
3.2.1.1.1.	África (Suazilandia, Gubhlo)	58
3.2.1.1.2.	Argentina (Córdoba y La Rioja).....	58
3.2.1.1.3.	Australia	59
3.2.1.1.4.	Austria	59
3.2.1.1.5.	Suecia	59
3.2.1.1.6.	España	59
3.2.1.1.6.1.	Ávila.....	59
3.2.1.1.6.2.	Córdoba.....	59
3.2.1.1.6.3.	Extremadura	59
3.2.1.1.6.4.	Galicia.....	60
3.2.1.1.6.5.	Huelva	60
3.2.1.1.7.	Portugal.....	60
3.2.1.2.	Toma de muestras.....	63
3.3.	TRABAJO DE LABORATORIO	64
3.3.1.	Microscopía Óptica.....	64
3.3.2.	Microscopía Electrónica de Barrido con Energía Dispersiva (EDS).....	64

3.3.3.	Difracción de Rayos-X.....	65
3.3.4.	Técnicas de Biología molecular	65
3.3.4.1.	Aislamiento del ADN.....	65
3.3.4.2.	Amplificación del ARN 16S.....	68
3.3.4.3.	Secuenciación FLX-454.....	68
3.3.5.	Análisis bioinformáticos.....	68
3.3.5.1.	Qiime 1.7.0	69
3.3.5.2.	SILVAngs 1.2.....	69
3.4.	TRABAJO DE GABINETE	70
4.	RESULTADOS	75
4.1.	RESULTADOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO 75	
4.1.1.	Morfología	75
4.1.1.1.	Espeleotemas cilíndricos Individualizados:	75
4.1.1.1.1.	De techo:.....	75
4.1.1.1.2.	De suelo:.....	76
4.1.1.2.	Espeleotemas cilíndricos en césped:	76
4.1.1.3.	Espeleotemas planares o flowstone:.....	76
4.1.1.3.1.	Microgours:	77
4.1.1.4.	Estromatolitos:.....	77
4.1.2.	Sedimentología	78
4.1.3.	Mineralogía.....	79
4.1.3.1.	Biominales autigénicos amorfos (mineraloides).....	79
4.1.3.2.	Biominales autigénicos cristalinos.....	79
4.1.3.2.1.	Microcristales de sulfato cálcico.....	80
4.1.3.2.2.	Microcristales de halita.....	80
4.1.3.2.3.	Microcristales de calcita.....	80
4.1.4.	Biología	82
4.1.4.1.	Bacterias.....	84

4.1.4.2.	Hongos	85
4.1.4.3.	Amebas testáceas	86
4.1.4.4.	Algas diatomeas	98
4.1.4.5.	Artrópodos (Filo <i>Arthropoda</i>)	102
4.1.4.5.1.	Hexápodos (Subfilo <i>Hexapoda</i>)	102
4.1.4.5.1.1.	Colémbolos (Orden <i>Collembola</i>)	102
4.1.4.5.1.2.	Tisanuros (Orden <i>Thysanura</i> - <i>Zygentoma</i>)	104
4.1.4.5.1.3.	Lepidópteros (Orden <i>Lepidoptera</i>)	105
4.1.4.5.2.	Crustáceos (Subfilo <i>Crustacea</i>)	105
4.1.4.5.2.1.	Isópodos (Orden <i>Isopoda</i>)	105
4.1.4.5.3.	Quelicerados (Subfilo <i>Chelicerata</i>)	106
4.1.4.5.3.1.	Arácnidos (Orden <i>Araneae</i>)	106
4.1.4.5.3.2.	Ácaros (Orden <i>Acarina</i>)	106
4.1.4.6.	Vertebrados	107
4.1.4.6.1.	Anfibios	107
4.1.4.6.2.	Reptiles	108
4.1.4.6.3.	Mamíferos	108
4.1.4.7.	Otros restos biológicos	109
4.1.4.7.1.	Polen	109
4.1.4.7.2.	Fitolitos	115
4.2.	RESULTADOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	115
4.2.1.	Mineralogía	115
4.3.	RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (ANÁLISIS GENÉTICOS)	115
4.3.1.	Análisis cuantitativos	116
4.3.2.	Biodiversidad bacteriana y abundancia, su rol en los espeleotemas	116
4.3.2.1.	Arqueas	120
4.3.2.2.	Actinobacterias	120
4.3.2.3.	Proteobacterias	122

4.3.2.4.	Acidobacterias	122
4.3.2.5.	Chloroflexi.....	123
4.3.2.6.	Firmicutes	123
4.3.2.7.	Pertenecientes a otros filos bacterianos.....	123
4.3.3.	Diferencias entre las cuevas estudiadas.....	124
5.	DISCUSIÓN.....	197
5.1.	LAS CUEVAS GRANÍTICAS SON UN ECOSISTEMA CONSERVADO	197
5.1.1.	Los bioespeleotemas son microecosistemas.....	197
5.1.2.	Flujo de energía y ciclo de nutrientes.....	199
5.1.3.	Minerales y biomineralización mediada por bacterias.....	200
5.1.3.1.	Ópalo amorfo	202
5.1.3.2.	Sulfato de calcio (yeso)	202
5.1.3.3.	Halita.....	202
5.1.3.4.	Calcita.....	203
5.1.4.	Participación de los medios subterráneos en los ciclos biogeoquímicos	203
5.1.4.1.	El ciclo del silicio	203
5.2.	GÉNESIS DE LOS BIOESPELEOTEMAS	204
5.2.1.	Introducción.....	204
5.2.2.	Etapas 1: Etapa detrítica o de acumulación de clastos	206
5.2.3.	Etapas 2: Colonización de microorganismos	206
5.2.4.	Etapas 3: Formación del hidrogel de silicio y precipitación de ópalo A	209
5.2.5.	Etapas 4: Crecimiento de microcristales.....	211
5.2.6.	Crecimiento de tipo estromatolítico	213
5.3.	MICROORGANISMOS QUE FORMAN LOS BIOESPELEOTEMAS	214
5.3.1.	Análisis de los datos de secuencia	214
5.3.2.	Contraste entre los diferentes métodos bioinformáticos aplicados	215
5.3.3.	Diversidad bacteriana en las cuevas estudiadas frente a la literatura	215
5.3.4.	Clasificación taxonómica.....	217
5.3.4.1.	Bacterias.....	218

5.3.4.1.1.	Actinobacterias.....	218
5.3.4.1.2.	Cianobacterias	219
5.3.4.1.3.	Proteobacterias	220
5.3.4.1.4.	Otros filos bacterianos	221
5.3.4.2.	Hongos	222
5.3.4.3.	Amebas testáceas	222
5.3.4.4.	Algas diatomeas	224
5.3.4.5.	Artrópodos (Filo <i>Arthropoda</i>)	227
5.3.4.5.1.	Hexápodos (Subfilo <i>Hexapoda</i>)	227
5.3.4.5.1.1.	Colémbolos (Orden <i>Collembola</i>)	227
5.3.4.5.1.2.	Tisanuros (Orden <i>Thysanura</i> - <i>Zygentoma</i>)	228
5.3.4.5.1.3.	Lepidópteros (Orden <i>Lepidoptera</i>)	228
5.3.4.5.2.	Crustáceos (Subfilo <i>Crustacea</i>)	228
5.3.4.5.2.1.	Isópodos (Orden <i>Isopoda</i>)	228
5.3.4.5.3.	Quelicerados (Subfilo <i>Chelicerata</i>)	229
5.3.4.5.3.1.	Ácaros (Orden <i>Acarina</i>)	229
5.3.4.6.	Vertebrados	230
5.3.5.	Otros restos biológicos.....	230
5.3.5.1.	Polen.....	230
5.3.5.2.	Fitolitos	230
5.4.	APORTACIONES DEL ESTUDIO DE LA VIDA EN ESTAS CUEVAS	231
5.4.1.	El origen de la vida y transición a medios terrestres	231
5.4.2.	Nuevas especies de extremófilos adaptadas a ambientes cavernícolas	233
5.4.3.	Aplicaciones biotecnológicas	234
5.4.4.	La nueva química de la vida basada en el silicio	235
5.4.5.	Cuevas como reservorio para la conservación de especies vulnerables y nuevas especies	236
6.	CONCLUSIONES.....	287
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	291

Capítulo 1

Introducción y Objetivos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. INTRODUCCIÓN

Ninguno de los planetas rocosos del Sistema Solar está formado exclusivamente por rocas sedimentarias que solo aparecen como delgados recubrimientos distribuidos de forma discontinua en su superficie. La mayoría de las rocas que forman los continentes son ígneas (volcánicas y plutónicas) (Bonin, 2012). Por ejemplo en la Tierra, el 66% de su superficie continental está cubierto por rocas sedimentarias (Blatt & Jones, 1975) (Tabla 1); sin embargo, la mayor parte de la superficie terrestre (aproximadamente el 75%), cubierta por los océanos, está formada mayoritariamente formada por rocas magmáticas (volcánicas). Y si nos referimos al interior de la Tierra su composición es totalmente ígnea.

<i>Porcentajes de los Tipos Rocosos Expuestos en los Continentes (Blatt & Jones, 1975)</i>					
Continente	Rocas Cristalinas				Rocas Sedimentarias
	Extrusivas	Intrusivas	Metamórficas	Total	
Asia	9	12	5	26	74
África	4	16	22	42	58
Norteamérica	11	6	31	48	52
Sudamérica	11	2	25	38	62
Europa	3	7	3	13	87
Australia	8	11	11	30	70
Superficie de la Tierra	8	9	17	34	66

Tabla 1: Porcentajes de los tipos rocosos expuestos en los continentes. Extraída de Blatt & Jones (1975).

Las rocas magmáticas, al contrario que las sedimentarias carbonatadas no tienen la propiedad de disolverse en agua. Por ello los geólogos y geomorfólogos han estudiado generalizadamente las cavidades y los sedimentos (espeleotemas) asociados a macizos de rocas carbonatadas ignorando, hasta hace muy poco tiempo, que en macizos de rocas magmáticas y en rocas sedimentarias no carbonatadas también existen sistemas subterráneos y espeleotemas, aunque normalmente sean de menores dimensiones. Sin embargo, cuanto mayor sea la superficie cubierta por rocas sedimentarias no calcáreas o por rocas magmáticas, mayor es la posibilidad del desarrollo de cavidades subterráneas incluso en esos otros tipos de roca. Además, al contrario de lo que ocurre en los terrenos cársticos, en las zonas de rocas magmáticas o sedimentarias no carbonatadas no se precisa de la disolución de la roca sino tan solo una circulación del agua hasta cierto punto precaria, pues su génesis es totalmente diferente, (Vidal Romaní & Vaqueiro, 2007) esencialmente debido a la tectónica y al *creep* rocoso.

Todo esto hace fácilmente comprensible el interés de la prospección del estudio de las cuevas de las rocas magmáticas (no solubles) debido a la novedad y originalidad del tema y también al hecho de que estas son las rocas más abundantes en la Tierra y fuera de ella. Sin embargo, las cuevas y las formaciones sedimentarias asociadas, son poco conocidas debido a sus pequeñas dimensiones y a la instrumentación requerida para el estudio de sus sedimentos, (esencialmente microscopía electrónica de barrido y biología molecular), pese a su gran valor paleobiológico y la existencia de nuevas especies que pueden ser muy importantes desde el punto de vista biotecnológico (Cheeptham, 2013).

1.2. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral pretende demostrar la existencia en las cuevas magmáticas estudiadas de un ecosistema único y cómo los organismos presentes en ellas, ejercen un papel directo en la formación de los bioespeleotemas, creando un microecosistema que se repite a lo largo de todo el mundo, independientemente de la zona climática o roca donde estos se formen. Esta idea ya ha sido desarrollada a lo largo de los últimos años desde que varios autores mencionaron la intervención de las bacterias en el proceso (Vidal Romaní & Vilaplana, 1983) y, debido a la evolución de los métodos de estudio, así como la integración de nuevos conocimientos en biología molecular, se están completando los resultados para una mayor comprensión de esta cuestión. Por ello, los objetivos principales son:

1. Identificar la composición microbiana y su efecto en la formación de los bioespeleotemas.
2. Estudiar la morfología, mineralogía, textura y estructura de los bioespeleotemas formados en cavidades desarrolladas en macizos de rocas magmáticas plutónicas.
3. Estudiar el proceso de génesis de los bioespeleotemas en relación con la actividad bacteriana.
4. Intentar identificar, mediante secuenciación genética masiva (pirosecuenciación), los microorganismos que forman los bioespeleotemas.

1.3. INTERÉS DEL TRABAJO

Este trabajo de tesis completa los datos existentes respecto a los organismos presentes en las cavidades desarrolladas en rocas magmáticas y su influencia sobre

éstas para la formación de depósitos o bioespeleotemas; siendo este campo de estudio interesante en otras ciencias o teniendo aplicaciones como:

- En Astrobiología: existe un intenso estudio realizado por geomicrobiólogos, orientado a los microorganismos que ocupan los ecosistemas subterráneos de la Tierra debido a su similitud con ambientes existentes en otros planetas, e incluso lunas donde se sabe que existe agua. Esto hace pensar que pueden o podrían haber albergado vida de características análogas a la que existe en los ambientes estudiados en esta tesis. Por lo que este estudio se podría entender como un ensayo en la Tierra para entender nuevas formas de búsqueda de la vida actual o primitiva fuera de la misma (Allwood *et al.*, 2013).
- El estudio del rol de las cuevas en el origen de la vida en la Tierra, ya que los afloramientos de nutrientes asociados a *blooms* planctónicos en periodos de transgresión marina, permite a los organismos adentrarse en el continente a través de las cuevas; adaptándose, más tarde durante las regresiones marinas, a las nuevas condiciones continentales mediante formas de resistencia.
- Descubrir nuevas especies en este nuevo mundo desconocido o mal estudiado hasta ahora. Es necesario incluir en el estudio de la biodiversidad, ambientes profundos y poco explorados como los estudiados en esta tesis.
- Aunque no es el objeto de esta Tesis doctoral, estudios para la producción de biomoléculas con potencial de aplicación en diferentes industrias como en alimentación, cosmética, farmacia, agricultura, petroquímica, etc. Las bacterias heterotróficas presentes en las cuevas podrían ser una fuente relevante para la industria debido a sus enzimas, sus metabolitos bioactivos, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticancer, insecticidas, alguicidas e inmunosupresivos (Dobretsov *et al.*, 2011; Tomova *et al.*, 2013; Rajput *et al.*, 2014). En especial, la caracterización de estas bacterias en estos ambientes es de gran interés por la conocida habilidad de las actinobacterias (el grupo más abundante) para producir nuevos antibióticos (Lazzarini *et al.*, 2000; Cheeptham 2013; Montano & Henderson, 2013; Derewacz *et al.*, 2014).

Capítulo 2

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1. LAS ROCAS MAGMÁTICAS

2.1.1. Introducción

Las rocas magmáticas (intrusivas o plutónicas y extrusivas o volcánicas) son las más abundantes en la Tierra (Figura 1) y en otros planetas o cuerpos rocosos de nuestro Sistema Solar y del Universo. Todas ellas tienen su origen en el enfriamiento de un magma, y por ello su composición química y mineralógica tiene grandes similitudes. Todos los tipos litológicos de rocas magmáticas que existen se pueden agrupar en 4 grandes tipos (Figura 2) que se diferencian por su composición química, esencialmente en la proporción de silicio (expresado como óxido de silicio) que varía entre el 30% y el 80% de su composición total; y también en su proporción en Ca, Na y K. A su vez, desde un punto de vista mineralógico, también es posible clasificar las rocas magmáticas por la proporción que existe en ellas de sus minerales principales: cuarzo, ortosa, plagioclasa, piroxenos, anfíboles, olivino y micas. Todos estos minerales son los silicatos, cuyo factor común es la presencia de Si en las redes cristalinas de sus minerales. El Si es sin duda el elemento químico más importante en nuestro caso ya que las fases de la sílice son las más apropiadas para guardar el registro orgánico de la Tierra y de otros planetas (Daza Brunet, 2015).

Además de la composición química y mineralógica, otra de las características comunes a las rocas magmáticas es su porosidad primaria nula (cuando no están meteorizadas) y su baja solubilidad ante el agua. Por esta razón, los procesos de alteración física o química son poco efectivos y se reducen a la parte más externa de los afloramientos rocosos, que es lo que se llama regolito o cubierta de alteritas. Sin embargo, la vida no necesita de la existencia de un regolito para desarrollarse ya que surge incluso sobre la propia roca (Abdulla, 2009), gracias a la presencia de agua que aprovecha las superficies definidas por la porosidad secundaria para infiltrarse en el interior de los macizos rocosos magmáticos.

La principal diferencia entre rocas magmáticas plutónicas y rocas magmáticas volcánicas es el modo en que se produce el enfriamiento del magma, que está en el origen de ambos tipos de rocas. Las rocas magmáticas plutónicas se consolidan en el interior de la tierra a profundidades de más de 20 km. Por esta razón su enfriamiento es lento y permite la formación de rocas totalmente cristalizadas (holocristalinas). Las rocas magmáticas se originan principalmente en el contacto entre placas litosféricas,

sean estos bordes de colisión con subducción o bordes extensivos. En el contacto entre dos placas en colisión, el rozamiento produce la fusión de la litosfera y su transformación en magma durante la breve etapa de ascenso que produce un rozamiento en el contacto con la roca encajante que forma la placa; y es cuando se produce el desarrollo de esos sistemas de discontinuidades, en especial la llamada *sheet structure* y sistemas de discontinuidades asociados a esta (Vidal Romaní & Twidale, 1999; Twidale & Vidal Romaní, 2005; Vidal Romaní, 2008). Cuando los procesos erosivos llevan a estas rocas magmáticas plutónicas a la superficie, la relajación o *creep* rocoso, permite que la roca se abra aprovechando estos planos de discontinuidad. Estos planos abiertos serán los que más tarde permitirán el ingreso del agua de escorrentía hacia el interior del macizo, dando lugar a la formación de cuevas o sistemas de cavidades que es en donde se desarrollan los procesos biológicos estudiados en este trabajo de tesis.

Por su parte, las rocas magmáticas efusivas o volcánicas tienen una evolución totalmente distinta. Como es bien sabido su llegada a la superficie se produce en estado fundido y, de hecho, se derraman sobre la superficie de la Tierra en forma de coladas basálticas donde igualmente se produce su consolidación por enfriamiento, aunque en este caso será mucho más rápido (días o aun años). No obstante, el enfriamiento no es homogéneo, pues es más rápido en su parte más externa mientras que la zona interna puede seguir en estado fluido y por tanto con posibilidades de moverse. Es así como se producen huecos y túneles de lava en las zonas más internas de una colada basáltica. Es un tipo de cavidad específica de coladas basálticas tipo *flood basalt, trapp*; y que son en realidad, los canales de drenaje subterráneos en las coladas basálticas durante su última etapa de flujo, previas a la consolidación total por enfriamiento. Tal vez su mayor importancia estriba en que son, junto a las cuevas de fisura, los tipos de cavidades más frecuentes en planetas rocosos extraterrestres. Estos conductos son sistemas de porosidad secundaria que permitirán el fácil acceso del agua de escorrentía hacia el interior del macizo; siendo los causantes de la evolución posterior de cuevas y sistemas de cavidades, en donde se desarrollarán los procesos de meteorización biológica y formación de depósitos o espeleotemas.

En resumen, los procesos formadores de cavidades en rocas magmáticas no solubles no precisan de la circulación de grandes cantidades de agua para su desarrollo. Se trata de medios subterráneos distintos a los cársticos y por tanto los resultados y conclusiones obtenidas no son de aplicación directa a los sistemas cársticos *sensu*

stricto. En resumen, las cuevas desarrolladas en rocas magmáticas se han formado por definición a partir de superficies de discontinuidad desarrolladas en la etapa final evolutiva del magma y sin intervención masiva del agua, que a lo sumo penetra lentamente en este medio subterráneo permitiendo así el desarrollo de una actividad, predominantemente microbiológica. Esta actividad microbiológica es por tanto incompatible con la circulación o acumulación de grandes cantidades de agua (que producen erosión), pero precisa de unos mínimos aportes al sistema subterráneo. Las condiciones de estos medios subterráneos son por tanto, independientes de la zona climática de la tierra en donde se desarrollen e incluso por su limitada exigencia de agua, puede ser factible en planetas rocosos extraterrestres que cumplan esta condición limitante.

2.1.2. Tipos de cuevas

La diferencia esencial entre las cuevas cársticas y las cuevas desarrolladas en rocas no solubles es específicamente su origen. Estas cavidades se desarrollan bien durante la etapa de consolidación (tubos de lava), bien a partir de estructuras de deformación tectónica del macizo rocoso consolidado durante la etapa de emplazamiento, *sheet structure* (cuevas de fisura), la posterior deformación durante la etapa elástica (tafoni), o finalmente por procesos superficiales gravitatorios o de transporte por agentes externos (fluviales, glaciales, marinos) (cuevas de bloques).

Las cavidades de rocas magmáticas donde se han estudiado los espeleotemas tienen unas dimensiones muy diferentes; y van desde pequeñas fisuras a grandes sistemas de discontinuidades desarrollados en rocas magmáticas plutónicas (graníticas) y se clasifican según su morfología y proceso de formación en (Figura 3):

2.1.2.1. Cuevas de fisura

Se desarrollan según las discontinuidades y los planos de diaclasa. (Vidal Romaní *et al.*, 2003) (Figura 4).

2.1.2.2. Tafoni

Desarrollados durante la etapa elástica de deformación del macizo. Una vez en superficie evolucionan hasta convertirse en un hueco desarrollado dentro de un bloque con diferentes morfologías (Vidal Romaní & Gracia Prieto, 1987; Vidal Romaní *et al.*, 2003) (Figura 5).

2.1.2.3. Cuevas de bloques

Se corresponden a las que se forman entre los bloques rocosos (Figura 6).

2.1.2.4. Tubos de lava

Ya nos hemos referido a la formación de este tipo de cavidades anteriormente. En ellas se ha descrito la presencia de espeleotemas (Anderson, 1930; Woo *et al.*, 2008) y se han descrito los procesos diagenéticos (Northup *et al.*, 2011) haciendo especial mención a la microbiota encontrada (Figura 7).

2.2. ESPELEOTEMAS

2.2.1. Primeros estudios

Aunque inicialmente fueron considerados como depósitos minerales (Caldcleugh, 1829), en estudios posteriores se han ido definiendo primeramente su composición mineral (ópalo amorfo) y posteriormente que eran esencialmente generados por la actividad microbiológica (Vidal Romaní *et al.*, 2010b, 2013, 2015; Vidal Romaní & Vaqueiro, 2007) del medio subterráneo. Actualmente, se considera que la mayor parte de los espeleotemas están constituidos por microorganismos, siendo la fracción mineral s.s., de importancia secundaria. Los organismos, tras su muerte, se incorporan al depósito como elementos de fábrica (Vidal Romaní *et al.*, 2015) y gracias a su naturaleza silíceo se favorece la preservación de las bioestructuras (estructuras biosedimentarias como microfósiles, estromatolitos y texturas de origen biológico) (Allwood *et al.*, 2013). Por este motivo, existe un amplio estudio de cuevas en rocas magmáticas (Cushing *et al.*, 2007) buscando posibles restos de vida primitiva en la Tierra. Estos resultados serían extrapolables a otros planetas como Marte, ya que la protección contra los rayos UV (Boston *et al.*, 2001; Léveillé *et al.*, 2010), la calidez y la presencia de agua (Baker *et al.*, 1991) en la subsuperficie, equivaldrían al ambiente presente, en los inicios de la vida en la tierra y actualmente en otros planetas (Westall *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2006).

Sin embargo, la mayoría de los estudios en cuevas corresponden a cavidades en rocas calizas. Por una parte, el estudio de las cuevas se ha limitado al recuento directo y mediante trampas de organismos visibles al ojo humano (Shu *et al.* (2013) en China, Sendra & Reboleira (2012) en el Cáucaso y Galán (1993) en España), cuyo fin no es estudiar los espeleotemas de la cueva, sino la ecología y la biocenosis de la misma. Mediante estos estudios se describen los organismos y sus características de adaptación a estos ambientes (troglobios o troglobiontes, troglófilos y troglóxenos) (Trajano & de Carvalho, 2017; Trajano, 2012; Racovitza, 1907; Schiner, 1854), describiendo especies endémicas y relictas que no han evolucionado y se han adaptado a las condiciones del medio subterráneo. Por otra parte, la existencia de

trabajos, cuyo principal objetivo es conocer el patrón de colonización y dispersión de los microorganismos en cuevas turísticas, así como el efecto en la salud humana (Jurado *et al.*, 2010) o en la conservación y deterioro de las cuevas y pinturas rupestres (Chabereiter-Gurtner *et al.*, 2002; Sáiz-Jiménez, 2012; Bastian *et al.*, 2009; Cañaveras *et al.*, 2006), ha hecho incrementar el interés por los estudios en geomicrobiología. Éstos se centran en comprender el rol de las comunidades bacterianas en la desintegración de la roca y su participación activa en los ciclos geoquímicos y de nutrientes (Engel *et al.*, 2010a), así como en la génesis de depósitos secundarios (Barton & Northup, 2007) y el papel de las algas, hongos y bacterias en la precipitación del carbonato cálcico (Northup & Lavoie, 2001). Estas relaciones geomicrobiológicas de interacción entre la roca y las bacterias se conocen como “biokarst” (Northup & Lavoie, 2001).

2.2.2. Estado actual del conocimiento

En la Tabla 1 se resumen las diferentes técnicas utilizadas en la bibliografía para el estudio de las comunidades bacterianas en cuevas y los resultados en cuanto a la biodiversidad de filos bacterianos encontrados. Como se aprecia en la tabla, el uso de las técnicas aplicadas ha ido evolucionando desde los experimentos de microbiología clásica y microbiología, hasta técnicas de biología molecular cada vez más sofisticadas, desde el análisis del ADNr 16S mediante RFLP, DGGE, FISH, métodos de secuenciación tradicionales (Sanger) y hasta secuenciación masiva, lo que ha incrementado la información disponible en cuanto a biodiversidad del medio.

2.2.2.1. En cuevas de calizas

En los últimos años han sido muchos los trabajos en cuevas de calizas en donde se ha estudiado la influencia sobre la roca de las comunidades de microorganismos. Para ello, habitualmente se toman muestras de matas de filamentos microbianos o biofilms de las paredes de las cuevas y de los espeleotemas (Engel *et al.*, 2004) que posteriormente se trata de identificar determinando las especies presentes mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación por PCR, análisis filogenéticos, secuenciación de ADN y FISH (fluorescencia de hibridación in situ) (Engel *et al.*, 2010b; Baskar *et al.*, 2014), así como también se han utilizado estudios de radioisótopos estables. La aplicación de estas técnicas ha llevado a conocer que en cuevas kársticas de azufre es habitual encontrar bacterias quimiolitotóxicas y sulfuro oxidantes de los grupos *Epsilonproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Engel *et al.*, 2010a; 2010b) así como grupos de bacterias anaeróbicas dominados por

Deltaproteobacteria y *Chloroflexi*, e incluso presencia de Arqueobacterias. Otros filos de bacterias que dominan estos sistemas cavernícolas en caliza son: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Streptomyces*, *Thiothrix*, *Proteobacteria*, *Planctomyces*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* y *Actinobacteria* (Cheeptham, 2013), *Firmicutes* y *Nitrospirae* (Epure *et al.*, 2014). Además, también se ha detectado la existencia de hongos (*Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Zygomycota*) (Epure *et al.*, 2014; Popović *et al.*, 2015; Man *et al.*, 2015) o cianobacterias (Popović *et al.*, 2015; Coombes *et al.*, 2015) (Tabla 1).

Esta información se ha obtenido aplicando una metodología que presenta grandes limitaciones. Una de las técnicas más utilizadas consiste en describir la morfología de los microorganismos mediante la microscopía óptica y o la electrónica de barrido aunque en la mayor parte de los casos se llega a clasificaciones muy poco precisas (por ejemplo definiéndolas como filamentos reticulados (Melim *et al.*, 2008) y cocoides (Popović *et al.*, 2015)).

Recientemente ha habido un gran avance cuando se han incluido las técnicas de la biología molecular lo que ha permitido identificar organismos que no pueden ser detectados por otros medios, mediante técnicas metagenómicas de secuenciación masiva (pirosecuenciación) (Ortiz *et al.*, 2014; Vaughan *et al.*, 2015) llegando a identificarse más de 2000 unidades taxonómicas, lo que prueba la gran diversidad orgánica que existe en este tipo de medios. Gray & Engel (2013) lo utilizaron en muestras de aguas de cuevas desarrolladas en rocas carbonatadas llegando a identificar hasta 11 filos diferentes de bacterias mientras que Tetu *et al.* (2013), en matas microbianas desarrolladas en cuevas calizas, describen tan solo 6 filos de bacterias. Kumaresan *et al.* (2014) estudiando también matas microbianas identificó tan solo 4 filos de bacterias. Ortiz *et al.* (2014) han registrado 7 filos diferentes analizando estalactitas y agua de goteo en cuevas de caliza (Kartchner Caverns, USA) y Kieraitė-Aleksandrova *et al.* (2015) han identificado hasta 24 filos a una profundidad de hasta 1640 m. Adicionalmente, esta técnica se ha utilizado para rastrear genes específicos y realizar estudios de metabolismos sulfuro oxidantes en cuevas donde se presume esa acción por parte de los microorganismos (Jones *et al.*, 2014).

2.2.2.2. En tubos volcánicos

Las cuevas en lava o tubos volcánicos se extienden por todo el Mundo y muchos autores han estudiado en ellas diferentes aspectos, desde la fauna de invertebrados a

las comunidades microbianas (Northup *et al.*, 2013). Esta fauna ha sido estudiada con diferentes fines. Por un lado han sido estudiados tubos volcánicos (Isla Ascensión) para identificar la fauna propia de un estadio temprano en los procesos colonización, adaptación y evolución de la vida subterránea. Los organismos (escorpiones, arañas, ácaros oribátidos, pseudoescorpiones, isópodos, decápodos, colémbolos, tisanuros, coleópteros, himenópteros, lepidópteros y dípteros), algunos de ellos endémicos, han sido identificados mediante muestreo con trampas y búsqueda activa (Ashmole & Ashmole, 1997). Por otro lado, la biota ha sido estudiada para dilucidar su influencia en la creación de los espeleotemas en estos ambientes.

La identificación de los microorganismos en estas cuevas, en principio se ha basado en técnicas de microbiología clásicas (mediante cultivos) y observaciones al microscopio electrónico de barrido (Tabla 1) (Léveillé *et al.*, 2000; Melim *et al.*, 2008; Northup *et al.*, 2011). Actualmente, se realizan estudios moleculares desde su primera aplicación por Northup *et al.* (2008; 2013) en Hawaii, Azores y Nuevo México y Cockell *et al.* (2013) en Islandia). Estos métodos han permitido identificar hasta 14 filos del dominio Bacteria (Northup *et al.*, 2013) y a concluir que las actinobacterias son las bacterias más abundantes en estos medios. Estas contribuyen a la meteorización de la roca volcánica y al ciclo de los carbonatos y silicatos, aumentando la tasa de disponibilidad de Mg, Ca y Si (Cockell *et al.*, 2013). Sin embargo, se sigue utilizando el microscopio electrónico de barrido con EDX para identificar formas filamentosas, cocoides, filamentos reticulares y a modo collar de cuentas dispuestas en cadena (Northup *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2014) (Tabla 1). Estas identificaciones son complementadas con análisis moleculares de filogenias y; adicionalmente a los estudios biológicos, a través de la difracción de rayos X y los análisis EDX, también se determinan los componentes minerales de la muestra.

Los estudios realizados en tubos volcánicos, aparte de identificar los organismos, también han permitido catalogar diferentes tipos de espeleotemas según su contenido en sílicio y otros elementos menores. Daza & Bustillo (2014) estudiaron estromatolitos de cuevas volcánicas (Branca Opala cave, Terceira, Islas Azores), y espeleotemas con una estructura laminar y capas de minerales con óxidos de hierro, con estructura alveolar, microláminas de ópalo, capas porosas con texturas oolíticas y microláminas de acumulación sobre la roca volcánica.

Recientemente, Riquelme *et al.* (2015a) han utilizado la tradicional microscopía electrónica de barrido en combinación con técnicas moleculares de secuenciación

clásica (Sanger) y de segunda generación (pirosecuenciación) para estudiar el filo Actinobacteria, lo que les llevó a concluir que estos medios están compuestos, en su mayoría, de Actinomycetales y otros órdenes más raros (Euzebyales, Rubrobacterales, Solirubrobacterales, Coriobacterales y Gaiellales) poniendo en evidencia el desconocimiento actual de estos ambientes lo que por otra parte aporta una gran esperanza por las posibilidades de identificación de nuevas especies.

2.2.2.3. En cuevas de rocas magmáticas

Algunos autores han señalado la existencia de depósitos en este tipo de cuevas, aunque estos trabajos se reducen a meras descripciones morfológicas a partir de su examen *de visu* y análisis químico del depósito (Anderson, 1930; Halliday, 1963; Quick, 1972; White, 1976; Carrol, 1978; Webb, 1979; Cody, 1980; Webb & Finlayson, 1984; Roqué & Pallí, 1996; Welange & Pathmakumara, 2010). Sin embargo, el papel de los organismos en la formación de los depósitos había sido poco estudiado hasta que algunos autores (Vidal Romaní *et al.*, 1983; 2003; 2007; 2010 a; 2013; 2014b; Sallstedt *et al.*, 2014) (Tabla 1) identificaron, mediante técnicas isotópicas y de microscopía electrónica de barrido, los organismos típicos de estos ambientes (bacterias filamentosas, hongos, algas, amebas testáceas (González *et al.*, 2013), granos de polen, diatomeas, quistes, colémbolos (López Galindo, 2013), pseudoescorpiones, escarabajos, opiliones, arácnidos, ácaros, diplópodos, decápodos, anfípodos, coleópteros y dípteros).

Esta biodiversidad ha sido identificada en lugares geográfica y climatológicamente muy diferentes (Vidal Romaní *et al.*, 2014b, 2015), lo que ha mostrado que su formación está íntimamente ligada a la circulación del agua independientemente del clima exterior a la cueva (Vidal Romaní *et al.*, 2010b, 2015) (Tabla 1).

Recientemente, Vidal Romaní *et al.* (2015) hacen el mayor estudio microbiológico hasta el momento, donde mediante pirosecuenciación identifican hasta 350 géneros diferentes de bacterias y arqueas pertenecientes a 29 filos; y que han sido estudiados con más en detalle en esta tesis. Además, los autores caracterizan químicamente el mineral más habitual en estos medios, que es el ópalo-A, mediante XRD y clasifican morfológicamente los diferentes tipos de espeleotemas que existen en cuevas de rocas graníticas y el resto de biominerales asociados a estos depósitos.

2.2.2.3.1. Evolución de la clasificación de espeleotemas

Desde la primera mención a este tipo de depósitos en 1829 hasta que se comienzan a estudiar de forma generalizada utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido (Vidal Romaní, 1985), el criterio usado para clasificar los espeleotemas de rocas magmáticas ha sido principalmente su morfología. Así Caldcleugh (1829), denominó coraloideas a los espeleotemas cilíndricos de techo por su similitud con ese tipo de bioconstrucciones marinas. Esta nomenclatura ha sido la más seguida hasta la actualidad (Woo *et al.*, 2008), a pesar de no existir ningún criterio racional que lo justifique (ni es una formación biológica marina ni su composición tiene nada que ver con un coral). Es digno de mención que desde el comienzo de su descubrimiento algún autor (Kashima *et al.*, 1987) ha intuido algún tipo de relación entre estos espeleotemas y los microorganismos. Kashima *et al.* (1987) interpretan erróneamente algunos de estos depósitos como “aglomerados de diatomeas” entendiendo la acumulación como una tafocenosis no como una verdadera tanatocenosis formada por estos organismos algales.

Otro de los criterios de clasificación de este tipo de depósitos es el mineralógico aunque debido a las pequeñas dimensiones de la muestra se trata de identificaciones muy aproximadas. El mismo Caldcleugh (1829), y después todos los autores posteriores identifican estos depósitos como formados por ópalo s.l., y no es hasta muy recientemente cuando se empiezan a publicar estudios mineralógicos muy detallados de estos espeleotemas (Vidal Romaní *et al.*, 2015).

También existen nomenclaturas empleadas en la literatura previa que los asimilan a sus homólogos cársticos: estalactitas, estalagmitas y flowstone (Anderson, 1930; Hill & Forti, 1986; Wray, 1999), asumiendo erróneamente que, como sus congéneres en cuevas calcáreas, se forman por el goteo del agua desde el techo (estalactitas) (Caldcleugh, 1829) al suelo de la cavidad (estalagmitas y flowstone). Así como también es utilizada otra nomenclatura que, a veces, resulta imprecisa: de tipo coraloide (Hill & Forti, 1997; Sallstedt *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014), de tipo popcorn (Wray, 1999) y recubrimientos botroidales (Daza & Bustillo, 2012).

En 2003, Vidal Romaní *et al.* (2003) establecen una clasificación más concisa de los diferentes tipos de depósitos en estos medios, dividiéndolos en:

- Espeleotemas cilíndricos asociados a puntos de goteo (estalactitas).
- Asociados a capilaridad (falsas estalagmitas) (Vidal Romaní *et al.*, 1998a).

- Espeleotemas desarrollados en láminas y producidos por la circulación del agua en un flujo laminar que recubren la superficie de la roca (flowstone) (Vidal Romaní *et al.*, 1998a).
- Acumulaciones con bordes sinuosos que contienen agua temporalmente (dripstone y gour-dams)
- Halos de ópalo A alrededor de puntos de salida del agua (rimstone) (Sweeting, 1973; Hill & Forti, 1997).

Más tarde, Vidal Romaní & Vaqueiro Rodríguez (2007) señalan que los espeleotemas cilíndricos con puntos de goteo (estalactitas) pueden formar asociaciones (espeleotemas coraloides) o mostrar crecimientos por capilaridad (antiestalactitas) individualizados o en grupos que son más delgadas que las estalactitas y Vidal Romaní *et al.* (2010a) completaron la anterior clasificación de los bioespeleotemas distinguiendo:

- Estalactitas s.s. (formadas en las fisuras y techo de las cuevas).
- Estalactitas en césped (asociaciones de espeleotemas cilíndricos en techo, suelo o pared de las cuevas).
- Anti-estalactitas (espeleotemas individuales de ópalo A que crecen por capilaridad).
- Espeleotemas planares (microformas debidas a un flujo laminar del agua).
- Coladas (Flowstone) (cubiertas continuas en la superficie de la roca).
- Microgours (acumulaciones de clastos de ópalo A con un desarrollo lineal y sinuoso).

Actualmente, la clasificación más simplificada es la siguiente (Vidal Romaní *et al.*, 2014a):

- espeleotemas cilíndricos (individualizados, en césped, estalactitas, estalagmitas y estromatolitos terrestres análogos a los que se forman en caliza)
- espeleotemas planares (algunos con morfología de microgour).

Añadiéndose finalmente a esta clasificación, un tipo especial de bioespeleotema llamado microestromatolito terrestre (Figura 8) (Vidal Romaní *et al.*, 2015). Este término fue aplicado inicialmente para depósitos edáficos por Wright (1989), en un breve espacio de tiempo se ha aplicado a espeleotemas tanto a fuentes termales o depósitos de sinter (Konhauser *et al.*, 2001), tubos volcánicos (Bustillo *et al.*, 2010;

Daza *et al.*, 2012, López-Martínez *et al.*, 2016), cuevas en cuarcitas, (Aubrecht *et al.*, 2008, 2012) y areniscas (Gradziński *et al.*, 2010).

Por ultimo, la terminología mas genérica que define los sedimentos asociados a cavidades es: “Espeleotema”. La palabra, que procede del griego ‘depósitos en cavidades’, se refiere generalmente a depósitos asociados a cuevas desde el inicio de su formación (“tema” porque es un depósito y “speleo” porque se forma en cuevas de *spelaeon* (caverna). Algunos autores, sin embargo, han acuñado el término *speleosol* (Spilde *et al.*, 2009) para estas mismas formaciones, aunque estrictamente un suelo formado dentro o fuera de una cueva tiene unas características totalmente distintas a las que presentan los espeleotemas (estalactitas, estalagmitas y coladas). En el caso concreto de las cuevas desarrolladas en rocas magmáticas los espeleotemas han sido construidos por organismos. Por esta razón el término que nos parece más adecuado es el de bioconstrucción o bioespeleotema según nos refiramos al proceso o al resultado sedimentario final.

2.2.2.4. En otras cuevas

Las cuevas desarrolladas en cuarcitas (p.e., en los tepuis venezolanos) también han sido lugar de interés para estudiar las características morfológicas de las comunidades bacterianas que forman sus grandes espeleotemas. Aubrecht *et al.* (2008) aplican métodos petrográficos, XRD y microscopía electrónica de barrido y distinguen más de una docena de formas diferentes y filamentos de cianobacterias (Tabla 1). Posteriormente, Aubrecht *et al.* (2012) realizan una descripción más detallada estudiando los depósitos mediante análisis químicos, petrográficos y biológicos describiendo tanto la macrobiota como la microbiota. Sin embargo, Barton *et al.* (2014) aplicando técnicas de luminiscencia, conteo celular y análisis genéticos (de cultivos de muestras en laboratorio), concluyen que los grupos de bacterias más abundantes son los taxones *Actinomycetales* y *Alphaproteobacteria*, cambiando esta diversidad hacia el interior de la cueva hacia donde presenta mayor abundancia el taxon *Ktedonobacterales* (*Chloroflexi*). En otras cuevas de cuarcitas (Mawmsai – India) Baskar *et al.* (2009) estudiaron las interacciones geomicrobiológicas entre la roca y los microorganismos mediante estudios de XRD, identificando calcita y yeso en los espeleotemas; así como bacterias cubiertas con precipitados de sulfatos de calcio aplicando técnicas de MEB. También se han realizado en este tipo de espeleotemas estudios petrográficos donde se evidencia un crecimiento de tipo estromatolítico, y se identifican bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Actinomycetes* con

técnicas moleculares. Recientemente, Ghezzi *et al.* (2017) estudiaron estromatolitos terrestres utilizando técnicas de secuenciación masiva revelando la abundancia de los filos *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* sobre otros menos abundantes pero presentes en todas las muestras (*WPS-2*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*), así como también a presencia de Arqueas y de otras bacterias sin clasificación taxonómica conocida.

Otro tipo de cuevas donde se han estudiado los depósitos son las cuevas artificiales. Un ejemplo es la estación de metro en Estocolmo (Kungsträdgårdens). En ella, Ivarsson *et al.* (2013 a y b) estudiaron con técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido el granito expuesto a la luz artificial e identificaron comunidades de cianobacterias (Tabla 1), diatomeas, dípteros, colémbolos, anélidos, nematodos, crustáceos, briófitos y arañas sobre depósitos de minerales secundarios de tipo flowstone, estactítico o coraloides laminados.

Más recientemente, Tisato *et al.* (2015) han estudiado, combinando análisis mineralógicos y morfológicos con análisis moleculares tradicionales de secuenciación de ADN, el rol de la microbiota en la formación de helictitas en una cueva de carbonatos (Asperge Cave), concluyendo su papel activo en el proceso de formación de espeleotemas en contra de la gravedad.

2.3. MINERALES

2.3.1. Introducción

La mineralogía de los espeleotemas estudiados en cuevas de rocas graníticas aunque variada puede decirse que es muy homogénea a escala mundial: las mismas especies minerales en todos los lugares estudiados hasta ahora. Los minerales identificados en diferentes lugares corresponden a entornos geográficos y climáticos muy variados (Vidal Romaní *et al.*, 2015). El único requisito que se precisa para su formación es la disponibilidad del agua en el sistema lo que justifica la actividad biológica desarrollada en su interior y finalmente la formación de los bioespeleotemas, (Vidal Romaní *et al.*, 2015); no parecen sin embargo ser factores limitantes o excluyentes la composición mineralógica y química de la roca mas allá de tratarse de una roca silicatada.

Para caracterizar la mineralogía del espeleotema se utilizan diferentes técnicas: Difracción de rayos X que muestran el ópalo A (Webb & Finlayson 1984), Análisis por

absorción de infrarrojos que permiten reconocer el origen del silicio hidratado y los análisis de Fluorescencia de rayos X (XRF) que muestran que el espeleotema está compuesto de silicio hidratado (ópalo). Y además, los análisis de Espectrometría de dispersión (EDS) y del espectro de absorción (IR) que identifica cristales de cuarzo y feldespatos producidos por la alteración de la roca y transportados hasta el espeleotema.

En cuanto a su composición, diferentes análisis existentes en la literatura han mostrado una composición mayoritaria de minerales amorfos no cristalizados, como el ópalo-A, acompañados de otros elementos en menor abundancia (Al, Fe, Ca, K, P, S), agua y materia orgánica (Vidal Romaní y Vilaplana, 1983; Sanjurjo *et al.*, 2007). En otros casos los identifican como alófanos síliceas (con elementos como Al, Si, Fe, Ca, Ti, K, Na, óxidos de Zn y Mn y tierras raras) y amorfos de óxidos e hidróxidos de hierro (ferrihidrita) (Daza & Bustillo, 2012; 2014b).

Como se ha visto, en los espeleotemas existen diversos minerales y las clasificaciones pueden ser diversas; una de las clasificaciones más recientes que se han realizado es según su origen (Vidal Romaní *et al.*, 2014a, 2015) en:

2.3.1.1. Minerales heredados

Los minerales heredados provienen de la destrucción de la roca donde la cavidad se desarrolla y por tanto, no son relevantes para nuestro trabajo.

2.3.1.2. Minerales autigénicos

Los minerales autigénicos se han formado en la misma cavidad, pudiendo ser amorfos o cristalinos. Los amorfos presentan el mayor número de especies citadas hasta ahora: evansita, bolivarita, estruvita, biotita, taranakita, alófano, hematites, goethita y ópalo-A (Tabla 2). Todos están formados por la meteorización química de la roca, muchas veces en combinación con la actividad biológica desarrollada en la cueva.

2.3.1.3. Minerales autigénicos amorfos

El ópalo-A ($\text{SiO}_2 \cdot 15 \text{H}_2\text{O}$) es el más interesante. Este mineral fue caracterizado por diferentes técnicas analíticas: Análisis químicos elementales, Difracción de Rayos X (XRD), Fluorescencia de Rayos X (XRF) y Análisis térmicos diferenciales (DTA-GTA) (Vidal Romaní y Vilaplana, 1983; Vidal Romaní *et al.*, 2010). Es un polimorfo de sílice

cuya formación implica la disolución previa del silicio, incrementada por meteorización bioquímica debida a bacterias, algas, hongos y líquenes (Vidal Romaní *et al.*, 2010a) y la posterior precipitación del hidrogel de silicio por sobresaturación por evaporación, proceso que tiene un rol importante en la nucleación y desarrollo de los minerales autigénicos aun en situaciones de muy baja concentración.

2.3.1.4. Minerales autigénicos cristalinos

Morfológicamente se distinguen dos tipos: drusas y microcristales. En ellos, la nucleación y el crecimiento de los cristales se ha producido físicamente en el hidrogel de silicio en continuidad física aunque no cristalográfica. Los microcristales y drusas forman grandes agrupaciones visibles al ojo humano con múltiples maclas. Las especies minerales más frecuentes son el yeso-anhídrita y calcita-aragonito. Por otro lado, los microcristales tienen menores dimensiones (máximo 4 μm) y aparecen como cristales individualizados aislados o a lo sumo en maclas biáxicas. Hasta ahora han sido identificados, halita, plumboaragonito y malaquita (López Galindo, 2013; Vidal Romaní *et al.*, 2014c). Estos minerales autigénicos suelen aparecer en grupos monominerales y su identificación se realiza con el microscopio electrónico de barrido (MEB) combinado con el análisis de la simetría cristalina, complementado con análisis químicos semicuantitativos elementales utilizando la difracción de los electrones retrodispersados. Solo en muestras con gran abundancia de la fase mineral es posible combinar estas técnicas con la de difracción de Rayos X.

2.3.1.4.1. Microcristales y “lepisferas” de yeso ($\text{SO}_4\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Aunque inicialmente los microcristales se habían identificado como whiskers los estudios posteriores demuestran una gran variabilidad morfológica y de simetría cristalina. Así puede decirse ahora que es mas correcto referirse a ellos como microcristales y maclas de yeso. Vidal Romaní *et al.* (2010c) han señalado la presencia de cristales de yeso en cuya formación influyen los microorganismos presentes, ya que algunos como bacterias y hongos (y sus asociaciones líquénicas), descomponen la materia orgánica generando azufre reducido (H_2S), que rápidamente se oxida a SO_4^- , el cual es combinado con el Ca de las plagioclasas para formar yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Franklin *et al.*, 1994; Welch & Ullman 1996). Estas precipitaciones se dan en forma bien de whiskers de yeso (Ziegenbalg *et al.*, 2011) bien como maclas de forma globular o hemisférica (lepisferas) (Figura 9A) (Vidal Romaní *et al.*, 2015) y que aparecen indistintamente asociados a espeleotemas planares (flowstone) o cilíndricos

sobre la base de ópalo-A (Figura 9B). Durante la formación de los microcristales de yeso, durante la última etapa de crecimiento del espeleotema, la progresiva escasez de agua hace que se produzca una transición entre la variedad hidratada de sulfato cálcico (yeso monoclinico) a la variedad anhidra del sulfato cálcico (anhidrita rómbica).

2.3.1.4.2. Microcristales de Calcita CaCO_3

Se ha señalado la presencia de calcita en espeleotemas de ópalo en cuevas de basaltos y granito en Korea (Woo *et al.*, 2008), en Suecia (Sallstedt *et al.*, 2014), en California (Webb & Finlayson, 1987), en cuarcitas en Venezuela (Urbani, 1976) y en general en todo el Mundo (Vidal Romaní *et al.*, 2014a). El origen del C proviene del CO_2 atmosférico que el agua de lluvia introduce en el sistema subterráneo mientras que el Ca procede de las plagioclasas de la roca base. Por esto, este tipo de microcristales está asociado con el desarrollo de las cuevas en rocas magmáticas básicas o ultrabásicas, diabasas (Sallstedt *et al.*, 2014), sienitas (Vidal Romaní *et al.*, 1997), granodioritas (Vidal Romaní y Vilaplana, 1983) o basaltos (Woo *et al.*, 2008).

2.3.2. Formación del ópalo amorfo biogénico

El ópalo es un mineral que se compone de sílice hidratada con la fórmula $\text{SiO} \cdot n\text{H}_2\text{O}$. La precipitación de la sílice es un proceso geológico importante en estos ambientes y a la vez controvertido, dado que según la bibliografía su formación es debida a un proceso inorgánico, aunque también biológico (Benning *et al.*, 2004; Show *et al.*, 2015). Además, algunos autores (Dietz & Yayanos, 1978; Thatcher & Weaver, 1974) han desarrollado métodos de cultivo utilizando el gel de silicio como gelificante alternativo, aunque es poco utilizado dado que precisa de un tedioso método de preparación; así como también se ha utilizado como medio de conservación de esporas de hongos (Grivell & Jackson, 1969; Pérez García *et al.*, 2006; Windels *et al.*, 1993).

Según Webb (1984) el factor que causa la precipitación del silicio es mal conocido, aunque podría ser la evaporación a bajas temperaturas, o producido por cambios en el pH o por el aumento de la solubilidad del ópalo A con la temperatura. Para otros autores (Wray, 1999; Swartzlow & Keller 1937; Webb & Finlayson 1984) la precipitación del ópalo A se produce esencialmente por evaporación (Hill & Forti, 1997).

La precipitación del silicio también ha sido estudiada generalizadamente en sistemas geotermales. Lynne *et al.* (2005) describen el proceso mediante el cual se forma el ópalo-A iniciado por la agregación de nanoesferas, formando ordenamientos diferentes que con el tiempo evolucionan hacia estructuras más ordenadas desde el ópalo-A a ópalo C y CT en fuentes termales. Otros autores, Peng & Jones (2012), cuestionan que los microorganismos sean mineralizados con ópalo A rechazando que el ópalo precipite por un proceso biogénico, proponiendo que este simplemente se encostra, cuando el gel de silicio pierde el agua, sobre los organismos e incluso, en ocasiones, puede cambiar su morfología. Konhauser *et al.* (2001) han estudiado ambientes geotérmicos donde se dan fenómenos de silicificación y donde el rol de los microorganismos aún se considera como una cuestión a resolver. La biomineralización es el proceso que domina durante la construcción de este tipo de depósitos y con el microscopio electrónico de barrido se puede apreciar que los microorganismos son mineralizados con sílice que se deposita sobre su superficie, cementando colonias o células individuales, formando una matriz de ópalo amorfo de décimas de micras de espesor lo que confirma la hipótesis de Peng & Jones (2012). El análisis de por qué los microorganismos aparecen fosilizados dentro de una matriz sílicea ha sido ampliamente discutido en los últimos años. Lynne & Campbell (2003) en sistemas subterráneos con origen hidrotermal de baja temperatura afirman que una vez que se deposita ópalo A sobre los microorganismos, estos influyen en la posterior deposición y acumulación de sílice, influyendo en el paleoambiente; lo que se traduce en depósitos de diferente textura y en la transformación de este en ópalo CT, encontrándose fases intercaladas de estos minerales alrededor de los mismos.

De la misma forma, Cortés Escobedo (2005) confirma la hipótesis de que el ópalo se crea por la agregación de diversas capas de SiO_2 con fases polimórficas metaestables diferentes. Estas se originan debido a la exposición del silicio en la naturaleza a diferentes condiciones de temperatura, pH y presión atmosférica. Además, las capas de nanoesferas de SiO_2 empaquetadas se encontrarán recubiertas por grupos silanol que confieren la hidratación a la molécula de SiO_2 . Cortés Escobedo (2005) y Páez Garza (1991) han descrito el proceso por el que el ópalo se forma, precipita y envejece en condiciones de laboratorio a través de un proceso inorgánico a temperaturas de alrededor de 100°C. Estudios recientes lo han considerado como un proceso pasivo e inorgánico. Sin embargo, en estudios de laboratorio se han observado tasas de precipitación menores que las observadas en la naturaleza. Estas diferencias podrían deberse a la actividad microbiológica, y estudios recientes en fuentes termales postulan que los microorganismos facilitan este proceso (Jones & Peng, 2015; Benning *et al.*, 2004; Tourney & Ngwenya, 2014) a diferentes rangos de temperaturas.

Lynne & Campbell (2003) en ambientes subaéreos también estudian la deposición de ópalo A y fosilización de microorganismos en un amplio rango de temperaturas, aunque para estos sistemas 32° grados es una temperatura baja, en los ambientes estudiados en esta tesis describen procesos y formas similares a no más de 15 grados. Incluso se ha demostrado que la deposición del ópalo-A se puede dar también en climas fríos (Thiry *et al.*, 2014).

Phoenix *et al.* (2000) realizaron estudios de laboratorio con la cianobacteria *Calothrix* en soluciones sobresaturadas de silicio y revelaron, mediante microscopía electrónica de transmisión, que la mineralización tan sólo correspondía al exterior de las células (se trataría por tanto de recubrimientos o encostramientos del microorganismo). Esto ha llevado a la conclusión de que las cianobacterias fotosintéticas crean un ambiente alcalino (pH 7-9) causando la formación de coloides de sílice próximos a la superficie aunque son incapaces de penetrar en el interior la célula por su tamaño. Estos valores de pH debidos a la fotosíntesis, hacen que el silicio sea soluble en su estado monomérico y por tanto incapaz de fijarse en la superficie de las células; por ello, las células pueden incluso sobrevivir “silicificadas” (Figura 10), (aunque parece obvio que la silicificación solo se puede apreciar cuando el agua se ha evaporado). Esta viabilidad de las células comprobada midiendo la tasa fotosintética sugiere que esta mineralización no es notablemente perjudicial para los organismos (Phoenix *et al.*, 2000).

Otros autores señalan que las bacterias interaccionan con la solución de sílice y una vez que comienza el proceso de precipitación autocatalítica y abiótica del ópalo lo mejoran. Estando así la precipitación de la sílice amorfa controlada por deshidroxilación de grupos silanol formados abióticamente. La precipitación de la sílice se daría por la creación por las cianobacterias de un ambiente básico; sin embargo, este ocurre en toda la cueva siendo otras bacterias (actinobacterias) las que realizan este proceso (Benning *et al.*, 2004). También se ha señalado que las bacterias fotosintetizadoras retardan la precipitación de la sílice al incrementar el pH (Thanyakoop *et al.*, 2008).

En otros ambientes, como los estudiados en esta tesis y que no son fuentes termales, el ópalo es de origen biogénico. El silicio, en este caso, no viene disuelto en las aguas termales, sino que las bacterias desintegran la roca sobre la que viven y solubilizan el silicio para formar el ópalo amorfo. Éste precipita gracias a la rápida polimerización de sílice en forma de nanoesferas mediada por biomoléculas de la superficie celular y la

liberación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Furukawa, 2007; Cortés Escobedo, 2005) (Figura 11). Daza & Bustillo (2014c) también resaltan la influencia bacteriana en el proceso de formación de los espeleotemas silíceos, dado que los elementos que constituyen el espeleotema se aprecian como microesferas sobre la superficie de microorganismos, sin embargo, el proceso de precipitación se produciría de forma abiótica.

2.3.3. Textura y estructura

En los espeleotemas de cavidades graníticas existen diferentes tipos de texturas (Sanjurjo *et al.*, 2007; Vidal Romaní *et al.*, 2003): de tipo breichoide o conglomerática con clastos poliminerale, porosa con ópalo precipitado, compacta por precipitación del ópalo con recubrimiento masivo, rítmica en capas superpuestas en espeleotemas cilíndricos (Vidal Romaní & Vilaplana, 1983) y de tipo estromatolítico. La textura porosa permite que existan burbujas de aire dentro del espeleotema y algunos autores la han estudiado con la finalidad de averiguar cuál sería la atmósfera de la cueva en el momento de su formación (Blamey *et al.*, 2016), ésta además sería importante para el desarrollo de los microorganismos.

2.4. ORGANISMOS

2.4.1. Introducción

El estudio de la fauna de las cuevas puede abordarse desde diferentes puntos de vista. Existen numerosos estudios que se dedican a catalogar la fauna (macroorganismos) existente en la cueva (Arbea, 2005; Jordana *et al.*, 2012; Sendra y Reboleira, 2012), estudiando su relación con los diferentes ambientes de la misma y tomando la cueva como un ecosistema. Estos clasifican los organismos según sus niveles de adaptación a los entornos subterráneos (Pavan, 1958) en:

- Epígeos, que son organismos de ambientes de superficie pero que sus restos aparecen esporádicamente en ambientes cavernícolas.
- Troglóxenos, que se hallan tanto en biotopos crípticos epígeos como en bocas y zona de entrada de las cuevas y no presentan troglomorismos. Desde un punto de vista biológico las cuevas constituyen para éstos un hábitat de interés, sea por sus costumbres lucífugas o higrófilas, o bien por constituir un refugio para el descanso, actividades reproductivas, o como medio de protección ante depredadores. Desde un punto de vista trófico, su contribución al funcionamiento del ecosistema cavernícola es muy importante dado que los

residuos de la alimentación, sus cadáveres y sus restos, constituyen un aporte de materia orgánica de origen animal que es utilizado por numerosos invertebrados cavernícolas (Galán, 1993).

- Subtroglófilos, que tienden a elegir la cueva como su propio hábitat, pero que no se reproducen en ese medio y pueden también habitar en biotopos epígeos húmedos y oscuros.
- Troglófilos, organismos que viven su vida entera en una cueva, pero que no tienen ninguna adaptación particular para vivir en ellas.
- Troglobios, organismos que habitan y están restringidos al ambiente profundo de las cuevas y que poseen características adaptativas a las mismas (troglomorfismos).

Otros autores han pretendido relacionar de un modo más íntimo, los microorganismos con la formación de los depósitos en las cuevas para estudiar, por un lado el impacto que tiene la formación de biofilms en cuevas de interés turístico o cultural (Sáiz-Jiménez, 2012), y por el otro cómo estos organismos están íntimamente ligados a la construcción de los espeleotemas.

Como ya se dijo anteriormente el factor más importante y decisivo en el desarrollo de la vida en este tipo de cavidades (y no solo en las cuevas desarrolladas en rocas magmáticas) es la disponibilidad de agua en la cavidad (Vidal Romaní *et al.*, 2015). La entrada del agua al interior de la cavidad puede producirse directamente a través de fisuras parcialmente abiertas o bien por condensación directa a partir de la humedad retenida en la atmósfera de la cavidad. El agua, junto con otros factores abióticos (Riquelme & Northup, 2013) como luminosidad, flujos de aire y tasa de evaporación potencial determinan dentro de las cuevas cinco zonas (entrada, crepúsculo, transición, profundidad y zonas de estancamiento de aire). En cada una de ellas, se establecen diferentes comunidades de microorganismos debido a las diferencias en las características físicas del ambiente (Poulson & White, 1969). En las cuevas de carbonatos en las regiones tropicales es habitual que la base de la red trófica sean biofilms epilíticos; mientras que en otras, las comunidades microbianas obtienen la energía directamente de la oxidación o reducción de componentes inorgánicos (quimiolitótrofos) y otros obtienen la energía de la oxidación y reducción de materia orgánica (quimioheterótrofos) cuyos aportes de materia orgánica pueden venir del guano o los organismos (Riquelme & Northup, 2013). Esto es debido, por ejemplo, a que en zonas con luz los organismos de la base de la red trófica serán fotótrofos, mientras que si hay ausencia de luz estos estarán ausentes y la base del ecosistema

serán organismos quimioautótrofos. Por lo que los organismos normalmente se desarrollan preferentemente en las zonas más protegidas que en las zonas más expuestas (Wray, 1999), ya que las microvariaciones climáticas son más importantes para la formación de los espeleotemas que la tendencia climática regional (Vidal Romani *et al.*, 2015; Vaqueiro 2017).

2.4.2. Bacterias

Las bacterias son las formas de vida más antiguas sobre la superficie de la Tierra, existen evidencias de que aparecieron en nuestro planeta hace 3,8-3,9 miles de millones de años. Además, constituyen un grupo muy amplio y cosmopolita de células y, por esto, no es sorprendente que también aparezcan en las cuevas. Los cálculos sobre el número de células microbianas existentes en la Tierra señalan que el total es del orden de 5×10^{30} células y la cantidad total del carbono presente en este número tan enorme de células iguala al carbono de todas las plantas de la Tierra. Por tanto, las células microbianas por pequeñas que sean, constituyen la mayor porción de biomasa sobre la Tierra y son reservas importantes de nutrientes esenciales para la vida. Igualmente llamativo es el hecho de que la mayoría de las células microbianas no se encuentran en la superficie terrestre sino en la profundidad de los océanos y de las fisuras de la corteza terrestre o enterradas en los sedimentos. Estos hábitats mantienen diversas poblaciones de células microbianas que logran vivir mediante estrategias poco comunes y que crecen de manera extremadamente lenta.

2.4.2.1. El rol de las bacterias en geomicrobiología

2.4.2.1.1. Introducción

La Tierra se formó hace aproximadamente 4500 millones de años y las primeras formas de vida fueron células procariotas, muy probablemente similares a las bacterias actuales. Una de las primeras pruebas claves de la vida en la Tierra son fósiles de comunidades bacterianas antiguas llamados estromatolitos, que han sido datadas en aproximadamente 3400 millones de años de antigüedad. Los estromatolitos y trombolitos son depósitos órganosedimentarios encontrados en mares y lagos salinos, que están formados por comunidades de bacterias, las cuales atrapan partículas sedimentarias e inducen su precipitación en forma de sedimentos y minerales. Estos difieren en que los estromatolitos presentan un crecimiento laminar transversal, mientras que los trombolitos están formados por bacterias que inducen la precipitación de minerales precipitados sin una estructura laminar. En la superficie, que es generalmente rugosa, porosa y cubierta por mucílago, filamentos, partículas de

carbonato y a veces también sedimentos terrígenos van quedando atrapados, hasta que se produce la cementación y se forma una capa más; de esta manera la estructura aumenta en tamaño y por su naturaleza rocosa, los estromatolitos tienen potencial para perdurar como un fósil.

Algunos de los espeleotemas estudiados en esta tesis, en cuanto a su formación y contenido biológico podrían ser similares a los estromatolitos y por ello en la bibliografía se nombran como “estromatolitos terrestres” (Wright, 1989) en atención al medio de formación o “microestromatolitos” Vidal Romaní *et al.*, 2014a) en cuanto a las dimensiones de los mismos. Sin embargo debe admitirse que tanto los procesos como las condiciones de formación, son diferentes y poco conocidas hasta el momento.

La geomicrobiología (Barton *et al.*, 2001) es la ciencia que estudia las interacciones microbianas con los minerales. Recientemente han aumentado en esta rama, los estudios para entender el papel de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes esenciales y metales como hierro y manganeso (Zhou *et al.*, 2007); así como el estudio de la influencia de los microorganismos en ciertos procesos hasta ahora entendidos como meramente inorgánicos.

El motivo de la prospección de las cuevas, y en especial el estudio de sus organismos, es porque proporcionan información sobre la implicación de la actividad microbiológica en la formación de depósitos sedimentarios en ambientes subterráneos (espeleotemas). De la misma forma, el estudio los ciclos biogeoquímicos en las cuevas terrestres, proporciona información sobre las condiciones que posiblemente se pueden repetir en los ambientes subterráneos de planetas extraterrestres como Marte (Boston *et al.*, 2001). Por ello es interesante, ante la dificultad de traer muestras o para evitar que su contaminación (Rummel *et al.*, 2014), el estudio de estos microorganismos en ambientes análogos a los que probablemente existan en estos planetas “similares” a la Tierra.

Conocer los microorganismos que habitaron los primeros ecosistemas terrestres (Tourney *et al.*, 2014) y su influencia en los ciclos biogeoquímicos (Schopf *et al.*, 2007; Staudigel *et al.*, 2008), es clave para conocer el origen de la vida en el Universo (Northup *et al.*, 2012). Esto es debido a que estos tienen un papel activo en la mineralogía de la superficie, participando en la precipitación, disolución y transformación de los minerales así como en la producción de ácidos orgánicos

(Abdulla, 2009). Los microorganismos aportan, fruto de su actividad metabólica: C, P, y S; que junto con elementos como el Si y Al, procedentes de la roca original, dan lugar a los minerales superficiales (Banfield & Nealson, 1997; Konhauser *et al.*, 2004; Dupraz *et al.*, 2009; Boston *et al.*, 2001; Northup *et al.*, 2013).

La aplicación de técnicas de forma aislada con el objetivo de identificar ciertas especies de organismos, sin entrar en considerar su relación con los depósitos minerales, ha limitado el avance en el conocimiento. Durante mucho tiempo la investigación de los espeleotemas ha sido realizada aisladamente bien por geólogos bien por microbiólogos. Esto explica que el problema de la identificación se haya tratado de resolver partiendo de la identificación de los minerales bien de los organismos vivos (no se consideró hasta muy tarde la posibilidad de formas de vida extintas) y aplicando técnicas actualistas consistentes en el cultivo de muestras en el laboratorio. Este modo de trabajo es extremadamente restrictivo ya que por una parte solo considera lo que puede ser reproducido en el laboratorio y por otra se limita a organismos actuales. Los resultados obtenidos siguiendo esta línea de trabajo, dieron lugar a una idea errónea sobre la diversidad biológica en los medios subterráneos formados en rocas ácidas; hasta que el estudio fue retomado utilizando criterios geológico-paleontológicos (Vidal Romaní *et al.*, 2010a y b, 2015; Vidal Romaní & Vaqueiro, 2007) concluyéndose así que estos depósitos, deberían ser estudiados utilizando las técnicas que permitieran secuenciar genéticamente todos los restos de organismos preservados y luego asociar formas de vida al crecimiento o desarrollo de la base mineralógico-geológica, (Vidal Romaní *et al.*, 2013; 2015).

2.4.2.1.2. Las bacterias quimiolitotóxicas y las EPS

Los microorganismos quimiolitotóxicos forman la base de los ecosistemas subterráneos y establecen las interacciones geológicas que influyen en el desarrollo y el mantenimiento de las redes tróficas del ecosistema de la cueva (Lee *et al.*, 2012). Sin embargo, los estudios sobre cuevas y su fauna (organismos troglobios) son más habituales en rocas solubles (ambientes kársticos), ya que en estas cuevas de mayores dimensiones, los espeleotemas están más desarrollados. Aun así, y pese a las pequeñas dimensiones de sus depósitos, en las cuevas de rocas magmáticas se establecen importantes relaciones entre el medio y los organismos, señalando un origen microbiológico de los espeleotemas ampliamente reconocido por numerosos autores en diferentes tipos de cuevas (Léveillé *et al.*, 2000; Forti, 2001; Willems *et al.*, 2002; Urbani, 2005; Welinge & Pathmakumara, 2010) e influido por las sustancias

poliméricas extracelulares o EPS, que ejercen una actividad clave en la creación de los bioespeleotemas. Estas son segregadas por multitud de microorganismos como bacterias, cianobacterias y algas como diatomeas (Tourney & Ngwenya, 2014; Vignaga, 2012) y utilizados por otros microorganismos (bacterias) como fuente de carbono.

Las EPS son polímeros biosintéticos que fueron definidos por Geesey en 1982 como sustancias poliméricas extracelulares de origen biológico, que participan en la formación de agregados de microorganismos; y posteriormente como polímeros orgánicos de origen microbiano que, en biofilms, son responsables de la unión de células y otras partículas, aumentando su cohesión y la adhesión al sustrato e incrementando la resistencia a la deshidratación. Esta lámina de EPS puede retener y capturar nutrientes orgánicos e inorgánicos y también permite a los organismos autótrofos la transmisión de luz para realizar la fotosíntesis (Flemming & Wingender, 2001). Estas EPS están localizadas fuera de la célula y se ha visto que incrementan la meteorización de la superficie rocosa (Tourney & Ngwenya, 2014), incrementando las tasas de disolución de minerales debido a la formación de complejos orgánicos y metálicos en la superficie de debilidad entre el metal y el oxígeno en la estructura mineral (Tourney & Ngwenya, 2014; Barker *et al.*, 1998). Consecuentemente, la biomineralización y la precipitación de minerales sobre las células microbianas también se incrementan.

Existen numerosos experimentos de campo y laboratorio que han demostrado que los microorganismos pueden acelerar el proceso de meteorización de los minerales aluminosilicatos. En un primer lugar, el tamaño de poro ejerce un control primario en la distribución de los microorganismos entre las rocas y sedimentos. La disolución de los aluminosilicatos se realiza en función del pH, así como la presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular incrementan la disolución de elementos como el aluminio y el hierro. Una prueba más de su importancia es el estudio realizado por Barker *et al.* (1998) en el que el Si disuelto alcanza concentraciones 100 veces mayores en cultivos microbianos que en condiciones abióticas.

2.4.3. Amebas testáceas

Estas han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas por diversos autores en sedimentos de lagos (Patterson *et al.*, 2012) estudiando fósiles de plaquetas (idiosomas o exosomas) de diferentes especies y estableciendo edades según su

evolución mediante observaciones al microscopio electrónico de barrido (Barber *et al.*, 2013) y ritmos estacionales según el género en lagos (Davidova & Vasilev 2013). También han sido estudiadas en turberas donde son particularmente abundantes y cuyos datos son ampliamente aplicados al estudio paleoclimático (Swindles *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2008). En este sentido también se ha establecido una biogeografía de las mismas a través de sus estudios en suelos (Bobrov *et al.*, 2013; Wilkinson & Smith, 2006). Estos autores señalan como factores determinantes en la distribución de las tecamebas en turberas, la humedad y ciertos aspectos de la química del agua; otros, sin embargo, hacen alusión a gradientes de luz, temperatura, nutrientes y material para construir su testa.

En cuanto a su estudio en cuevas, han sido estudiadas en sedimentos por Van Hengstum *et al.* (2008), identificándose hasta 7 especies diferentes a través del análisis por microscopía electrónica de barrido con el fin de relacionar estos resultados con datos paleohidrológicos. Walochnik y Mulec (2009) también estudian las amebas testáceas que se encuentran en precipitados de carbonatos en cuevas kársticas de Eslovenia, analizando espeleotemas biogénicos, algunos con forma estromatolítica. Mazei *et al.* (2012) estudiaron amebas testáceas en cuevas de Rusia e Italia y encontrando hasta 27 especies. También García *et al.* (2013) realizaron estudios similares en la cueva Lascaux con el fin de valorar la conservación de las pinturas paleolíticas y otros elementos de patrimonio cultural estableciendo la relación entre las amebas y las bacterias patogénicas. Como se muestra, la diversidad de amebas testáceas en ambientes diferentes a las cuevas es muy amplia. Existen algunos estudios, aunque escasos, en depósitos de cuevas calcáreas aunque son casi inexistentes en cuevas de rocas magmáticas (González *et al.*, 2013; López Galindo, 2013). Además se ha visto que, lo mismo que en las turberas, en estas cuevas el agua tiene unos valores del pH altos, escasez de oxígeno y de nutrientes y altos niveles de agua, condiciones todas ellas que posibilitan la existencia de esta diversidad biológica tan característica. Por ello, en este trabajo se amplía la visión global de su presencia y distribución biogeográfica en cuevas desarrolladas en rocas magmáticas aportada anteriormente.

La testa (teca) de sílice es de gran importancia, dado que es la principal responsable de que estos organismos presenten grandes abundancias sobre la superficie de los espeleotemas estudiados en esta tesis y jueguen un importante rol en su formación.

2.4.4. Diatomeas

Las diatomeas en cuevas kársticas han sido estudiadas en diferentes localidades a lo largo de los años. Sin embargo, su presencia en cuevas de rocas magmáticas y su contribución en el desarrollo de los espeleotemas ha sido poco estudiada. Ivarsson *et al.* (2013b) han encontrado un total de 12 especies epífitas que viven en las paredes de la estación de metro Kungsträdgården en Suecia. Estos autores consideran la estación como una cueva artificial donde se desarrollan espeleotemas sobre los que se asientan comunidades de microorganismos; en este caso llamados *lampenflora* (Falasco *et al.*, 2014) dado que fotosintetizan gracias a la luz artificial de los túneles. Las especies encontradas son: *Diademsis contenta*, *Diademsis perpusilla*, *Pinnularia appendiculata*, *Nitzschia amphibia*, *Nitzschia sinuata*, *Caloneis cf. aerophila* y *Diploneis ovalis*.

Poulicková (2008) estudia la morfología y reproducción de la diatomea aerofítica *Luticola dismutica*, tomada de las superficies rocosas de una cueva en la República Checa, mediante raspaduras en paredes de las costras algales y posterior cultivo con análisis posteriores de microscopía óptica y electrónica.

Falasco *et al.* (2014) hacen una revisión sobre la formación de los biofilms y las diatomeas existentes en diferentes hábitats subterráneos dado que participan activamente en la construcción de los espeleotemas debido a las EPS excretadas. Esta autora recopila un total de 82 géneros, siendo los más frecuentes y abundantes especies aerofíticas y cosmopolitas como: *Hantzschia amphioxys*, *Diademsis contenta*, *Orthoseira roeseana*, *Luticola nivalis*, *Pinnularia borealis*, *Diademsis biceps* y *Luticola mutica*.

Finalmente, el estudio de estos ambientes poco conocidos hace que también dentro de este taxón autores como Lowe *et al.* (2013) hayan descrito nuevas especies del género *Orthoseira* en cuevas de tubos volcánicos de Hawaii mediante su estudio con microscopía óptica y electrónica.

2.4.5. Artrópodos

Los artrópodos que habitan las cuevas (pseudoescorpiones, escarabajos, opiliones, arácnidos, ácaros, diplópodos, decápodos, anfípodos, coleópteros y dípteros) (Sendra & Reboleira, 2012) se encuentran relacionados tróficamente con las bacterias que ayudan a disolver el silicio del cuarzo. Éstas en los espeleotemas reciclan la materia

orgánica y les proporcionan alimento. Por esto los microartrópodos están tan ligados a los espeleotemas donde se encuentran en gran abundancia. Dentro de este grupo, los ácaros y colémbolos se sabe que responden rápidamente a cambios de temperatura y humedad, ya que han sido estudiados por Liu *et al.* (2017) cuando se están sometidos a pulsos de lluvia que dieron lugar a cambios en abundancia de sus comunidades, aunque no en diversidad.

Los colémbolos son organismos troglobios muy bien adaptados a los ambientes cavernícolas. Es por ello que, en las cuevas estudiadas, por diversos autores, en todo el Mundo, se están descubriendo continuamente nuevas especies. Esto es debido a que estos ambientes no eran conocidos en tanta profundidad como ahora. Sin embargo, el enfoque del trabajo de estos autores es diferente al que se le da en esta tesis. Su metodología se basa mayormente en la recolección activa de ejemplares mediante aspiradores entre la hojarasca y trampas, en contraposición al modo de actuar en los espeleotemas donde se puede acceder únicamente a los restos de mudas incorporados a los espeleotemas ahogados por una fina capa de sílicio producida durante la desecación del espeleotemas (en la propia cueva durante la época de sequía o en el laboratorio cuando se prepara para su estudio al microscopio) estudiados en este trabajo. En cualquier caso los estudios realizados en cuevas magmáticas son prácticamente inexistentes, pues la mayoría de ellos se han realizado en cueva de roca caliza.

Entre los *Hexapoda*, los colémbolos constituyen un grupo muy antiguo, pues aparecen ya en el Devónico, hace unos 400 M.A. (Hirst & Maulik, 1926). En la Península Ibérica, el estudio de estos organismos ha sido muy tardío, siendo las cuevas calcáreas un hábitat habitual donde se han determinado. Las primeras descripciones de especies pertenecientes a este grupo son las realizadas por Navas (1906) y Pitarque (1906), seguidos por Bonet (1929) que fue el que realizó estudios sobre la fauna cavernícola en cuevas calcáreas de España.

En 1956, ya se habían datado nuevas especies del género *Plutomurus* en cuevas de Georgia (Djanashvili & Barjadze, 2011). En España, Da Gama (1985) estudió 33 especies de colémbolos en cuevas de Mallorca y Andorra, muchas de ellas nuevas (*Pseudosinella subcentralis*, *Heteromurus nitidus*) y 4 especies citadas por primera vez en España (*Onychiurus aguzouensis*, *Entomobrya purpurascens*, *Pseudosinella recipiens* y *Oncopodura tricuspidata*).

En EEUU, es también destacable el trabajo de Zeppelini y Kenneth (2003) en el descubrimiento de 7 nuevas especies del género *Arrhopalites* en cuevas de las Montañas Rocosas.

Arbea & Baena (2003) han realizado el primer catálogo de colémbolos cavernícolas de la región andaluza. Encontrando tres especies por primera vez en España (*Acherontiella xenylliformis* Gisin, 1952, *Lepidocyrtus flexicollis* Gisin, 1965 y *Entomobrya pazaristei* Denis, 1936). Arbea (2005), además, ha mencionado una nueva especie en cuevas de cuarcitas en el noroeste de Venezuela. Así como también, Baquero *et al.* (2005) han encontrado nuevas especies del género *Arrhopalites* en cuevas kársticas en Castellón. Finalmente, es destacable el trabajo de Jordana *et al.* (2012) donde describen tres nuevas especies de colémbolos cavernícolas del género *Pygmarrhopalites* y *Oncopodura* en cinco cuevas en El Maestrazgo (Teruel, España).

Por otra parte, otros autores Felderhoff *et al.* (2010) realizan estudios morfológicos y moleculares sobre el género *Pogonognathellus* en las montañas Apalaches y en una cueva. Lukić *et al.* (2010) también han descrito nuevas especies de la familia *Tomoceridae* con características troglomórficas en una cueva profunda en Croacia.

Ivarsson *et al.* (2013a) también encuentran estos organismos relacionados con depósitos flowstone y de tipo estactítico o coraloides laminados.

Debido a lo anterior se puede confirmar la homogeneidad de estos organismos a lo largo de las cuevas de todo el Mundo, independientemente de la roca base donde se asiente la cueva; así como también la existencia, en estos ambientes, de especies desconocidas para la ciencia y, sobre todo, en las cuevas desarrolladas en rocas magmáticas donde estas especies están adaptadas a condiciones estrictas.

2.4.6. Polen

El estudio del polen en cuevas es indicativo de la flora suprayacente, la instalada en el exterior de la cueva y que ha sido llevada hasta el espeleotema por las corrientes de aire que entran a la cueva desde el exterior o por el agua de infiltración. Este polen no sólo permite realizar un estudio actualista de la flora, sino que su registro podrá acumularse en los espeleotemas durante diferentes periodos, dejando registro paleo-palinológico temporal. En este caso, el estudio del polen indicará, de forma indirecta,

la vegetación del entorno de las cuevas; no solo presente sino pasada. Esto es debido a que estos granos quedan cementados en el seno de la fábrica porosa de los espeleotemas, ejerciendo como bioindicadores y proporcionando información de la paleoflora y de la antigüedad y conservación de los espeleotemas a lo largo de los años. Ya se ha dado el caso en la literatura de encontrar polen fósil en cuevas (Vernet, 1975; Sanjurjo & Vidal Romaní, 2011; Vidal Romaní *et al.*, 2010a; 2010b).

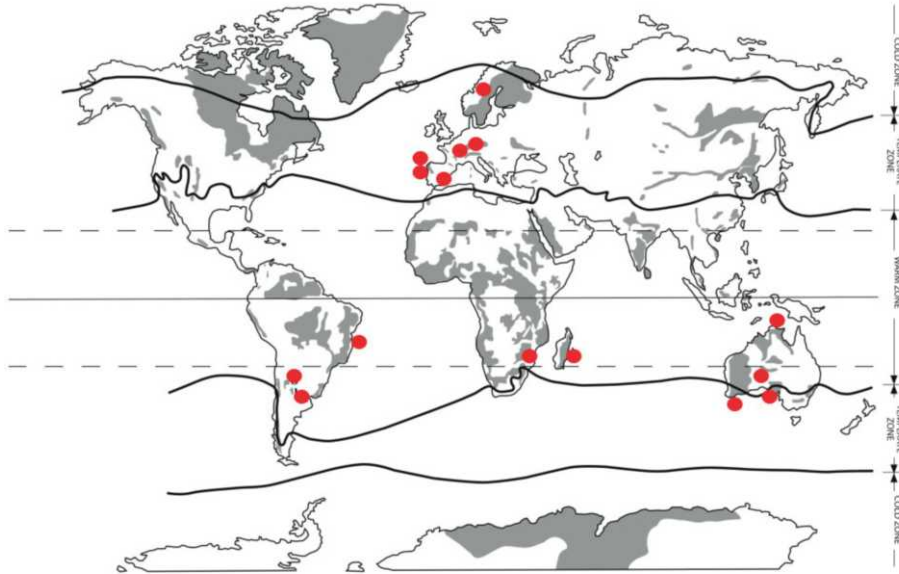


Figura 1. Mapamundi de zonas granitoides del Mundo y áreas muestreadas para el análisis de los espeleotemas en las diferentes regiones climáticas (Vidal Romaní, et al., 2015).

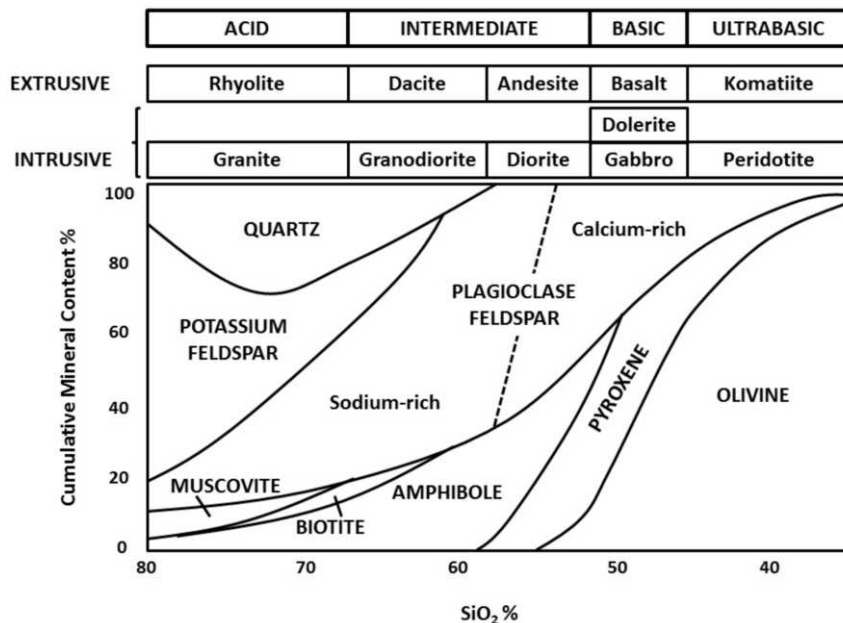


Figura 2. Contenido en sílice de tipos litológicos de rocas magmáticas extrusivas e intrusivas (modificado de Summerfield, 1991).

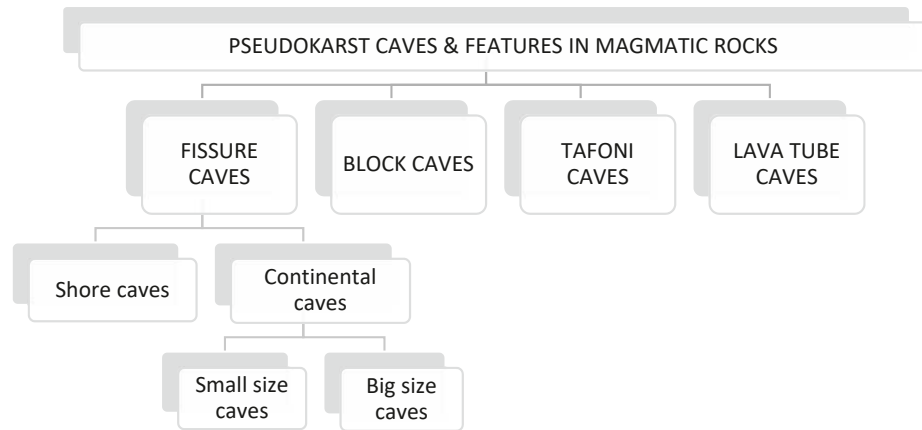


Figura 3. Esquema de las diferentes cuevas de Pseudokarst formadas en rocas magmáticas, modificado de Engel (2011).

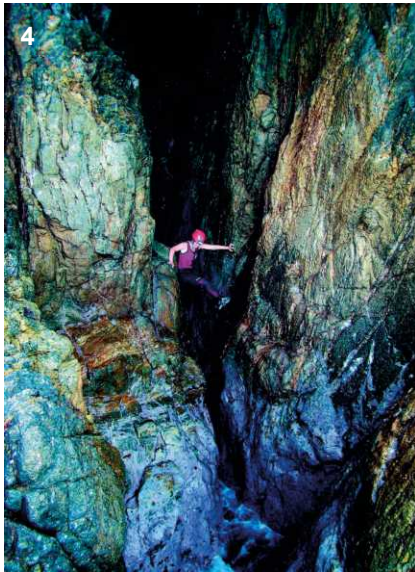


Figura 4. Cueva de Fisura Punta de Fontenova. Islas Ons. Extraída de inventario de Furnas de las islas Ons. Espeleo Club Aradelas.en Islas Ons, Galicia, España.



Figura 5. Cueva de tipo Tafone en Ézaro, O Pindo. Galicia, España.



Figura 6. Cueva de bloques en Albarellos parcialmente sumergida a lo largo del cauce del río Avia. Ourense, Galicia, España. (foto Marcos Vaqueiro)

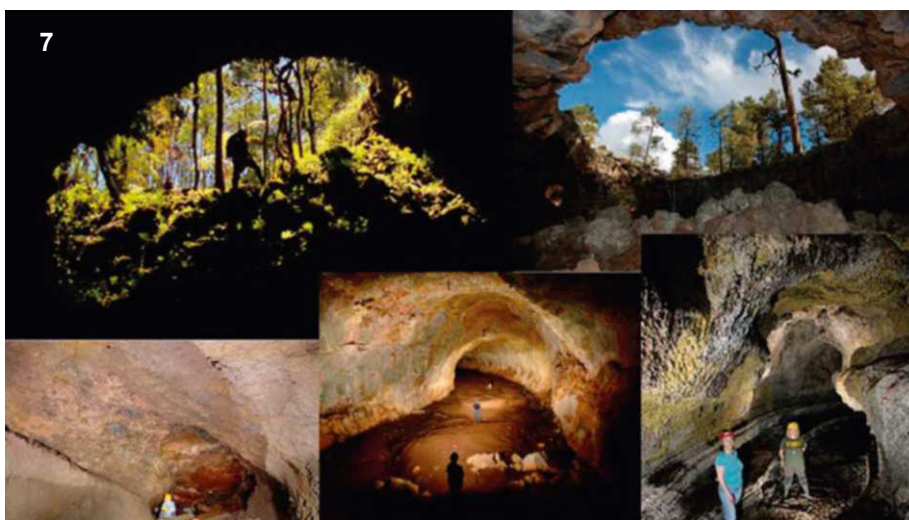


Figura 7. Lava caves in Hawai'i, New México, Australia, & the Azores. Extraído de Northup *et al.* (2013).

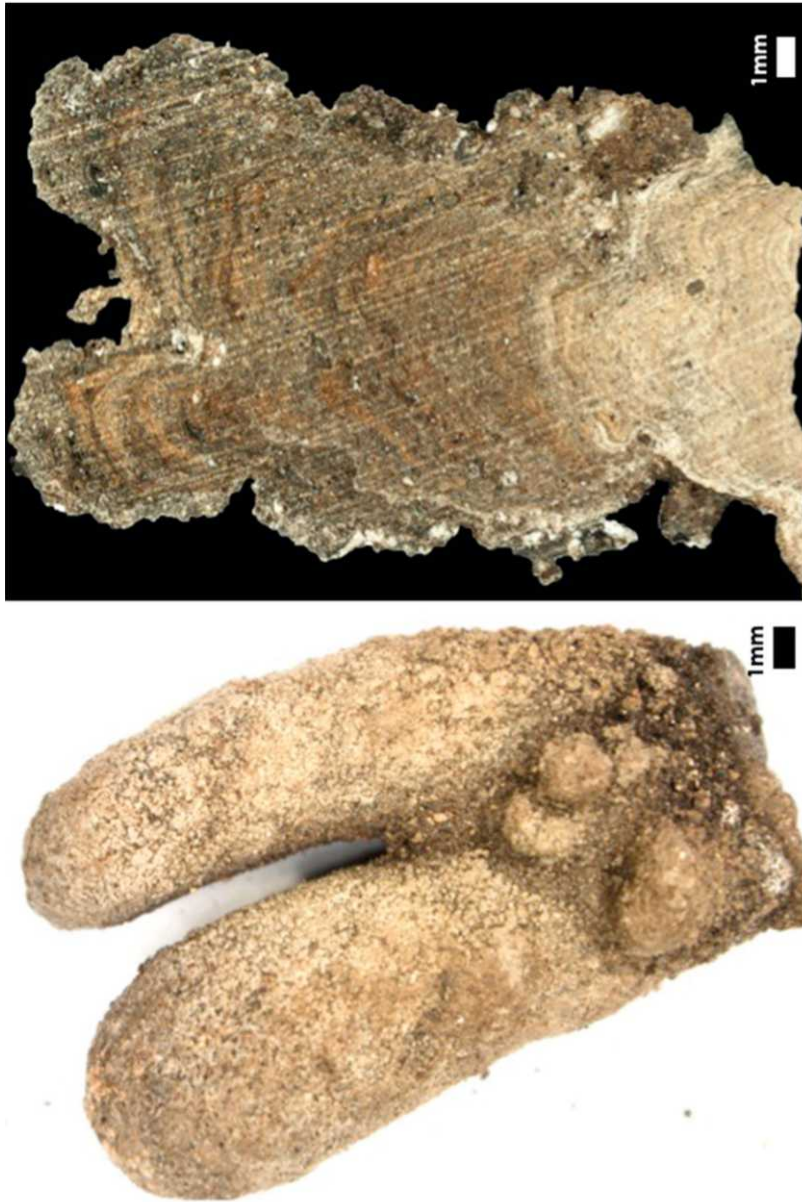


Figura 8. Estructura interna de microstromatolito terrestre de A Trapa, Galicia, España. (Vidal Romani *et al.*, 2015).

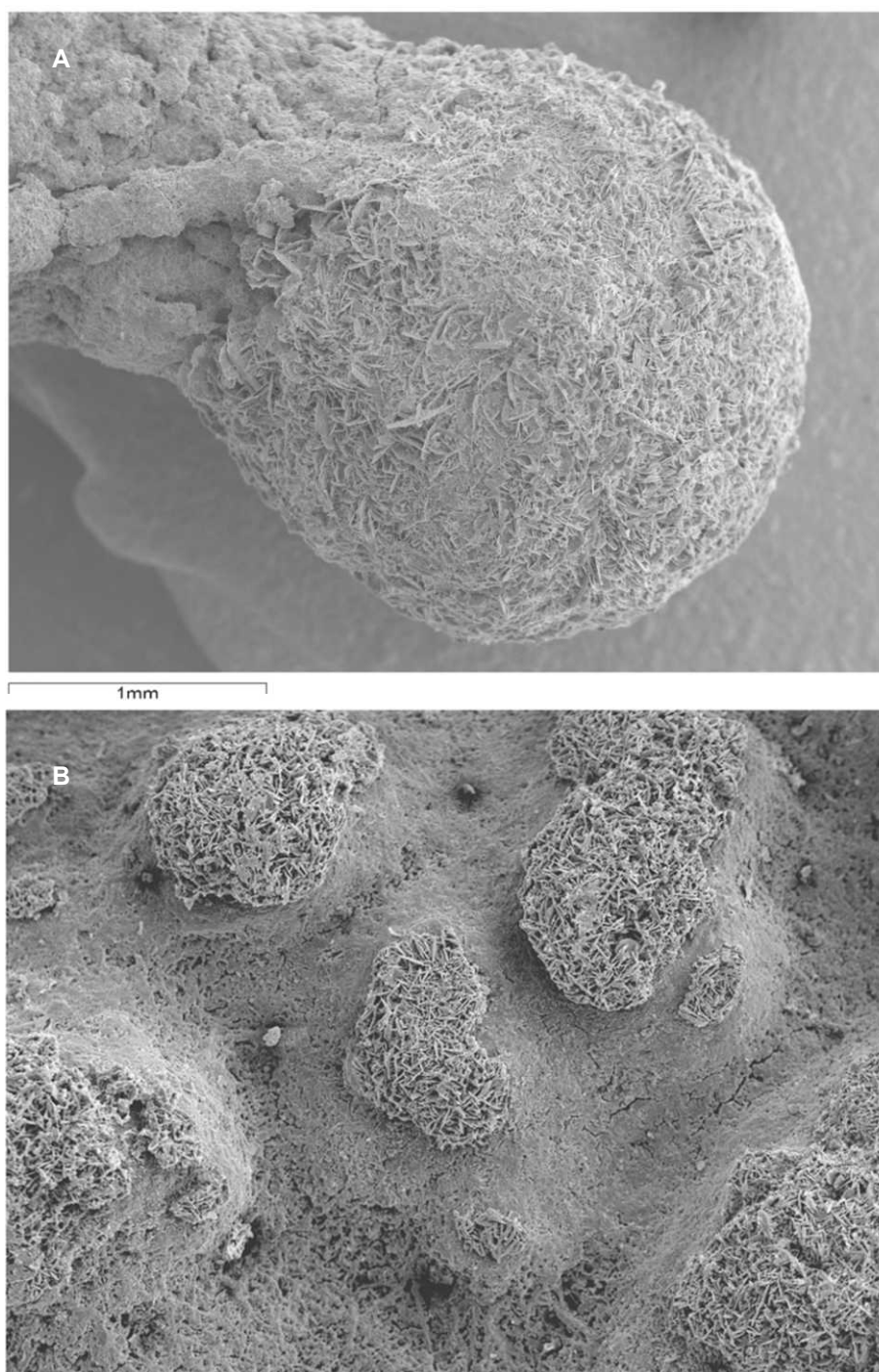


Figura 9. A: Hemiesfera de yeso en espeleotema cilíndrico. Castelo da Furna, Portugal. B: Hemiesferas de yeso en flowstone de ópalo-A. Los Riojanos, Córdoba, Argentina. (Fotografía Vidal Romani)

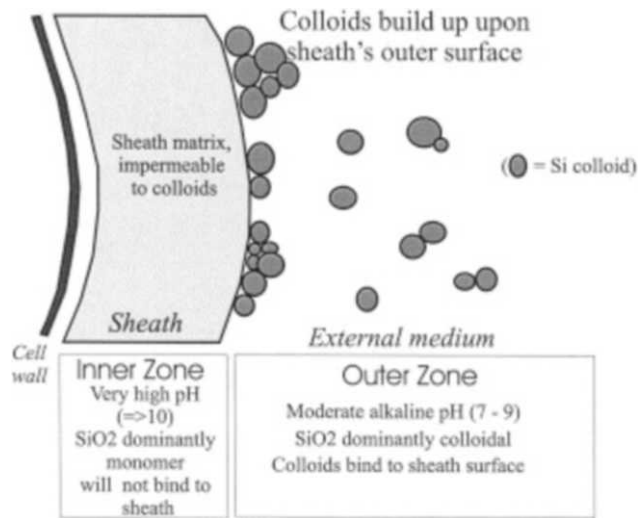


Figura 10. Modelo de la restricción de la silidificación sobre las células bacterianas descrito y extraído de Phoenix *et al.* (1999).

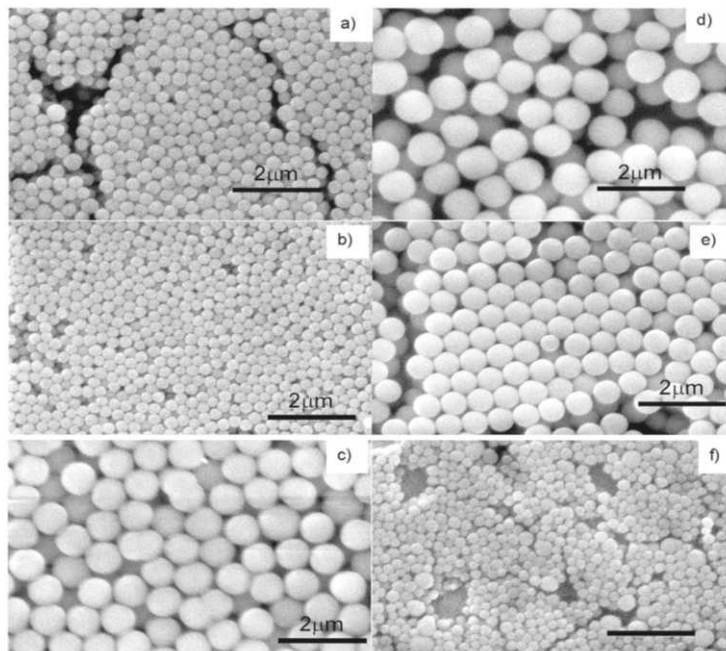


Figura 11. Micrografías obtenidas en el MEB a 15000 aumentos de esferas obtenidas manteniendo constante la concentración molar de TEOS en 0.28 y agua en 8 mol/l variando la concentración molar de NH₃: a) 0.25, b) 0.5 y c) 1.5 mol/l y manteniendo constante la concentración molar de NH₃ en 1 mol/l variando la concentración molar de H₂O en: d) 8, e) 10 y f) 12.5 mol/l. Cortes Escobedo (2005).

Comparison of Bacterial Phyla Found in Caves (1 of 5)											
Reference	Aubrecht et al., 2008	Barton et al., 2004	Barton et al., 2007	Barton et al., 2014	Baskar et al., 2009	Baskar et al., 2012	Baskar et al., 2014	Busquets et al., 2014	Cheetham et al., 2013	Chelius & Moore, 2004	Chen et al., 2009
Location	Chimantá Tepui	Fairy Cave	Carlsbad Cavern, rock	Roraima Tepui	Mawsmai and Krem Phyllut caves	Borra caves (India)	Sahastradhar a caves	Cova des Pas de Vallgornera	Helmcken Falls cave	Wind Cave	Mobile Cave
Main methods	SEM	SEM- 16S SSU-rDNAs RFLP	16S SSU-rDNAs RFLP	Sanger sequencing	SEM- 16S rDNA spring waters speleothem	16S rDNA	FISH SEM cultures Drip waters, moonmilk and stalactite	culture-16S rRNA water- Fe- Mn deposits Rock	SEM - 16S rRNA rock-speleothem-sediment	16S rDNA	16S rDNA
Samples	speleothem	wall biofilm	rock	sediments	spring waters speleothem	springwater mats				sediments	water
Cave tipe rock/ Bacterial phylum found	sandstone	limestone	limestone	sandstone	sandstone	limestone	dolomías	limestone	Volcanic	limestone	limestone
Actinobacteria	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
AD3		x	x	x						x	x
Archaea											
Armatimonadetes											
Bacteroidetes			x			x				x	x
Betaproteobacteria		x	x			x				x	x
BRC1											
Candidate division BD										x	
Chlamydiae											
Chlorobi											
Chloroflexi			x	x		x					
Crenarchaeota (Archaea)											
Cyanobacteria	x			x			x				
Deltaproteobacteria										x	
Epsilonproteobacteria											x
Elusimicrobia											
Euryarchaeota (Archaea)											
FBP											
FCPU426											
Fibrobacteres											
Firmicutes	x			x	x	x				x	x
Fusobacteria											
GAL15											
Gammaproteobacteria	x	x	x		x			x		x	x
Gemmatimonadetes											
GN02											
GN08											
Ktedonobacteria											
NBL-UPA2											
Nitrospirae						x					x
OD1/OP10											
OP11						x					
OP3											
OP5											
Planctomycetes						x				x	x
Proteobacteria			x	x	x	x				x	x
RCP2-18 X											
SBR1093											
SPAM											
Spirochaetes											x
SR1											
TA06											
Tenericutes											
Thaumarchaeota				x							
Thermoplasmatales											
Thermi											
Thermotogae											
TM6											
TM7											
Verrucomicrobia							x			x	x
WPS-2											
WS3											
WW3						x					
bacterial filaments	x				x						
coccoid or elongated microorganisms					x						
bacteria					x						
fungal community	x										

Tabla 1. 1 de 5. Comparación de los diferentes filos bacterianos en cuevas según diferentes autores en cuevas y muestras diversas que han sido estudiados mediante técnicas diferentes.

Comparison of Bacterial Phyla Found in Caves (2 of 5)											
Reference	Coombes et al., 2015	Cuezva et al., 2012	Dattagupta et al., 2009	Daza & Bustillo, 2014	Engel et al., 2010	Epure et al., 2014	Gray & Engel, 2013	Hathaway et al., 2014	Holmes et al., 2001	Ivarsson et al., 2013	Jones et al., 2012
Location	Palawan	Altamira Cave	Frasassi cave	Branca Opala cave	Lower Kane Cave	Western Carpathians of Romania	Comal County (Texas) 16S rRNA Sanger - 454 pyrosequencing	Terceira Cave	Nullarbor Cave	Kungsträdgårdens (Stockholm)	Frasassi cave system (Italy)
Main methods	Light microscopy	16S rRNA	16S rRNA FISH	Light microscopy, SEM	16S rRNA FISH	16S rRNA DGGE		16S rRNA DGGE	SEM - DNA analysis	SEM	Analisis químicos
Samples	rock	grey spots	biofilms	stromatolite	mats	sediment	water	microbial mats	biomass	speleothem	water
Cave type rock/ Bacterial phylum found	limestone cave	limestone	limestone	volcanic cave	limestone	limestone	carbonate	lava cave	limestone	granite	limestone
Acidobacteria	x	x			x	x		x	x		x
Actinobacteria					x		x	x	x		
AD3											
Alphaproteobacteria					x		x				
Archaea					x						
Armatimonadetes											
Bacteroidetes					x		x		x		
Betaproteobacteria					x		x	x			
BRC1											
Candidate division BD											
Chlamydiae											
Chlorobi					x						x
Chloroflexi					x	x	x				
Crenarchaeota (Archaea)											
Cyanobacteria	x									x	
Deltaproteobacteria					x		x	x	x		
Epsilonproteobacteria					x		x				
Elusimicrobia											
Euryarchaeota (Archaea)											x
FBP											
FCPU426											
Fibrobacteres											
Firmicutes					x	x	x	x			
Fusobacteria											
GAL15											
Gammaproteobacteria			x		x		x	x	x		x
Gemmatimonadetes						x					
GN02											
GN08											
Ktedonobacteria											
NBL-UPA2											
Nitrospirae					x	x	x	x	x		
OD1/OP10											
OP11											
OP3											
OP5											
Planctomycetes					x		x		x		
Proteobacteria			x			x	x		x		
RCP2-18 X											
SBR1093											
SPAM											
Spirochaetes											
SR1											
TA06											
Tenericutes											
Thaumarchaeota											
Thermoplasmatales											
Thermi											x
Thermotogae											
TM6											
TM7											
Verrucomicrobia					x						
WPS-2											
WS3											
WW3											
bacterial filaments				x							
coccoid or elongated microorganisms				x							
bacteria											
fungal community						x				x	

Tabla 1. 2 de 5. Comparación de los diferentes filos bacterianos en cuevas según diferentes autores en cuevas y muestras diversas que han sido estudiados mediante técnicas diferentes.

Comparison of Bacterial Phyla Found in Caves (3 of 5)												
Reference	Jones et al., 2008	Kieraitė-Aleksandrov et al., 2015	Kumaresan et al., 2014	Legatzki et al., 2011	Leveille et al., 2000	Lundberg et al., 2013	Macalady et al., 2008	Martin Sanchez et al., 2014	Meisinger, et al., 2007	Melim et al., 2008	Miller et al., 2014	Mulec et al., 2015
Location	Frasassi Cave	Krubera-Voronja	Moivle Cave	Kartchner Caverns	Hawaiian sea caves	Tjuv-Ante's Cave	Frasassi Cave	Lascaux Cave	Lower Kane Cave	Mexico and USA	Ana Heva lava tube (Chile)	caves in southwestern Slovenia
Main methods	16S rRNA	NGS - pyrosequencing soil, speleothem, water	NGS - pyrosequencing	DGGE PhylloChip DNA Microarray	SEM	SEM - DNA sequencing	16S rDNA - FISH	culture - 16S rDNA	16S and 23S rRNA	SEM	SEM	Cultures yellow subaerial biofilm
Samples	biovermiculations		microbial mats	stalactites	microbial mats	speleothem	biofilms	air	microbial mats	speleothem	speleothem	
Cave type rock/ Bacterial phylum found	limestone	limestone	limestone	limestone	basaltic	granite gneiss	limestone	limestone	limestone	limestone and basalt	volcanic	limestone
Acidobacteria	x	x		x					x			
Actinobacteria	x	x		x		x		x			x	x
AD3												
Alphaproteobacteria	x											
Archaea												
Armatimonadetes		x										
Bacteroidetes	x	x	x					x	x			x
Betaproteobacteria	x			x			x		x			
BRC1		x										
Candidate division BD												
Chlamydiae		x										
Chlorobi		x							x			
Chloroflexi	x	x		x								
Crenarchaeota (Archaea)												
Cyanobacteria		x	x		x							
Deltaproteobacteria	x			x			x		x			
Epsilonproteobacteria							x		x			
Elusimicrobia		x										
Euryarchaeota (Archaea)												
FBP												
FCPU426												
Fibrobacteres												
Firmicutes		x	x					x				x
Fusobacteria		x										
GAL15												
Gammaaproteobacteria	x			x			x		x			x
Gemmatimonadetes		x										
GN02												
GN08												
Kleidonobacteria												
NBL-UPA2				x								
Nitrospirae	x	x										
OD1/OP10		x										
OP11	x	x										
OP3				x								
OP5												
Planctomycetes	x	x										
Proteobacteria	x	x	x			x	x	x				
RCP2-18 X	x											x
SBR1093												
SPAM	x			x								
Spirochaetes		x										
SR1		x										
TA06												
Tenericutes												
Thaumarchaeota												
Thermoplasmatales												
Thermi		x										
Thermotogae												
TM6												
TM7	x	x										
Verrucomicrobia	x	x										
WPS-2												
WS3	x	x										
WW3												
bacterial filaments									x	x	x	
coccoid or elongated microorganisms											x	
bacteria						x					x	
fungal community						x		x				

Tabla 1. 3 de 5. Comparación de los diferentes filos bacterianos en cuevas según diferentes autores en cuevas y muestras diversas que han sido estudiados mediante técnicas diferentes.

Comparison of Bacterial Phyla Found in Caves (4 of 5)											
Reference	Northup et al., 2003	Northup et al., 2011	Onac et al., 2014	Ortiz et al., 2014	Pacton et al., 2013	Pasic et al., 2010	Porter et al., 2009	Portillo et al., 2008, 2009	Riquelme et al., 2015 b	Riquelme et al., 2015a	Rusznayk et al., 2012
Location	Lechuguilla & Spider Caves	Lava caves	Cova des Pas de Vallgornera	Kartchner Caverns	Botovskaya Cave	Slovenia Karst Cave	Multiple caves	Altamira Cave	Azores, Portugal and Hawaii and New Mexico	Azorean lava caves	Herrenberg Cave
Main methods	16S SSU-rDNAs RFLP	(SEM) - molecular techniques deposits- microbial mats	SEM	NGS - pyrosequencing	isotope - microscopy	16S SSU-rDNAs wall microbial community	16S rRNA	16S rDNA - DGGE	Sanger- SEM- 454 pyrosequencing	16S rRNA	SEM- 16S rRNA
Samples	deposits		mineral samples	stalactites drip water	stalactite		microbial mats	microbial mats	microbial mats	microbial mats	stalactite
Cave tipe rock/ Bacterial phylum found	limestone	Lava caves	limestone	limestone	limestone	limestone	limestone	limestone	volcanic caves	volcanic	limestone
Acidobacteria		x		x		x	x	x		x	x
Actinobacteria		x		x		x		x	x	x	
AD3											
Alphaproteobacteria	x	x				x	x	x			x
Archaea											
Armatimonadetes										x	
Bacteroidetes		x					x	x		x	
Betaproteobacteria	x	x				x	x	x			x
BRC1											
Candidate division BD											
Chlamydiae		x								x	
Chlorobi										x	
Chloroflexi		x		x		x		x		x	x
Crenarchaeota (Archaea)	x			x							
Cyanobacteria				x	x			x		x	
Deltaproteobacteria		x				x	x	x			x
Epsilonproteobacteria							x				
Elusimicrobia										x	
Euryarchaeota (Archaea)	x			x							
FBP											
FCPU426											
Fibrobacteres											x
Firmicutes	x	x		x			x	x		x	x
Fusobacteria											
GAL15											
Gammaproteobacteria	x	x					x	x			x
Gemmatimonadetes										x	x
GN02											
GN08											
Ktedonobacteria		x									
NBL-UPA2											
Nitrospirae	x	x		x			x	x		x	x
OD1/OP10		x								x	
OP11											
OP3											
OP5											
Planctomycetes		x		x		x	x	x		x	x
Proteobacteria		x		x		x	x	x		x	x
RCP2-18 X											
SBR1093											
SPAM								x			
Spirochaetes											
SR1							x				
TA06										x	
Tenericutes											
Thaumarchaeota				x							
Thermoplasmatales											
Thermi											
Thermotogae											
TM6										x	
TM7		x								x	
Verrucomicrobia		x				x	x	x		x	x
WPS-2											
WS3											
WW3											
bacterial filaments			x						x		
coccoid or elongated microorganisms									x		
bacteria					x						
fungal community											

Tabla 1. 4 de 5. Comparación de los diferentes filos bacterianos en cuevas según diferentes autores en cuevas y muestras diversas que han sido estudiados mediante técnicas diferentes.

Comparison of Bacterial Phyla Found in Caves (5 of 5)											
	Salstedt et al., 2014	Schabereiter-Gurtner et al., 2002	Shabarova and Pernthaler, 2010	Tetu et al., 2013	Tisato et al., 2015	Tomova et al., 2013	Urzi et al., 2010	Vaughan et al., 2015	Vidal Romani et al., 2014	Vidal Romani et al., 2007	Zhou et al., 2007
Reference											
Location	Tjuv-Ante's Cave	Tito Bustillo Cave	Swiss karst cave pools	Weebublie cave (Australia)	Asperge Cave (France)	Magura Cave, Bulgaria	Cave of Bats (Spain)	Kartchner Caverns FLX	Castelo da Furna (Portugal)	Granite Caves	Niu Cave
Main methods	SEM	Cultures - 16S rRNA	16S rRNA	16S rRNA - pyrosequencing	SEM- 16S rRNA	16S rDNA - RFLP	16S rDNA	454 Titanium sequencing technology	16S rRNA - pyrosequencing	SEM	16S rDNA - RFLP
Samples	speleothem	microbial mats	microbial mats	microbial mats	helictites	scrapping walls	microbial mats	speleothem	speleothem	speleothem	soil
Cave tipe rock/ Bacterial phylum found	granite-dolerite	limestone	limestone	limestone	limestone	limestone	limestone	limestone	magmatic caves	magmatic	limestone
Acidobacteria	x	x	x		x	x	x		x		x
Actinobacteria	x	x	x		x	x	x		x		x
AD3									x		
Alphaproteobacteria		x	x	x					x		
Archaea											
Armatimonadetes									x		
Bacteroidetes		x	x			x			x		x
Betaproteobacteria		x	x	x					x		
BRC1			x								
Candidate division BD											
Chlamydiae											
Chlorobi									x		
Chloroflexi		x							x		x
Crenarchaeota (Archaea)									x		
Cyanobacteria							x		x	x	
Deltaproteobacteria			x	x							
Epsilonproteobacteria											
Elusimicrobia									x		
Euryarchaeota (Archaea)									x		
FBP									x		
FCPU426									x		
Fibrobacteres			x								
Firmicutes			x			x	x		x		
Fusobacteria									x		
GAL15									x		
Gammaproteobacteria		x	x	x					x		
Gemmatimonadetes											
GN02									x		
GN08											x
Ktedonobacteria											
NBL-UPA2											
Nitrospirae			x						x		
OD1/OP10			x						x		
OP11			x								
OP3									x		x
OP5			x								
Planctomycetes			x						x		x
Proteobacteria		x	x	x	x	x	x		x		x
RCP2-18 X											
SBR1093											x
SPAM											
Spirochaetes											
SR1									x		
TA06											
Tenericutes									x		
Thaumarchaeota				x							
Thermoplasmatales											
Thermi									x		
Thermotogae											
TM6											
TM7			x						x		
Verrucomicrobia			x						x		
WPS-2									x		
WS3											
WW3											
bacterial filaments							x		x	x	
coccoid or elongated microorganisms							x		x	x	
bacteria							x			x	
fungal community	x						x	x		x	

Tabla 1. 5 de 5. Comparación de los diferentes filos bacterianos en cuevas según diferentes autores en cuevas y muestras diversas que han sido estudiados mediante técnicas diferentes.

Minerales formadores de espeleotemas en cuevas de rocas magmáticas			
Tipos de minerales	Mayoría de minerales	Whiskers	Nanominerales
Yeso		X	
Anhidrita		X	
Ópalo-A	X		
Calcita		X	
Aragonito		X	
Plumboaragonito			X
Halita			X
Evansita	X		
Pigotita	X		
Taranaquita	X		
Hematites	X		
Goethita	X		
Malaquita			X
Alófano	X		

Tabla 2. Minerales formadores de espeleotemas en cuevas de rocas magmáticas. (Vidal Romani et. al., 2015).

Capítulo 3

Metodología

3. METODOLOGÍA

3.1. TRABAJO BIBLIOGRÁFICO

Para la realización de este trabajo se han consultado diferentes artículos de investigación en cuevas donde se estudian, desde diferentes perspectivas, los espeleotemas que en ellas se encuentran. Estos utilizan metodologías de estudio que van desde técnicas de aplicación en el campo de geología, hasta técnicas aplicadas en microbiología y biología molecular. En este trabajo se han aplicado ambas con el objetivo de obtener resultados más relevantes y concluyentes a la hora de describir los depósitos que se estudian.

Para la búsqueda de los trabajos se han utilizado bases de datos como Scopus y Web of Science.

3.2. TRABAJO DE CAMPO

3.2.1. Cuevas

Las cuevas son sistemas biológicos únicos dado que en sus paredes se desarrollan microorganismos, los cuales tienen un papel muy importante en la meteorización, erosión de la roca y mineralización. Además, según Whitman *et al.* (1998), aproximadamente el 50% del total de la biomasa terrestre es vida procariota que se encuentra en la subsuperficie entre sedimentos y asociada a las aguas subterráneas. Además, las interacciones entre el agua y la roca en este ambiente, proporcionan numerosos sustratos como hidrógeno, para mantener actividad microbiana quimiosintética que participa en la creación de los depósitos cavernícolas.

En esta tesis doctoral se utilizará una clasificación simplificada de las cuevas (Vidal Romaní & Vaqueiro, 2007) eludiendo clasificaciones más complejas. Las cuevas no son el objetivo de estudio, sino un medio en el que se desarrolla vida para analizar el significado biológico y evolutivo de las mismas por su situación respecto al océano y continente (Rummel *et al.*, 2014).

3.2.1.1. Áreas a estudio

Las muestras analizadas corresponden a espeleotemas de la litoteca de Juan Ramón Vidal Romaní y depositada en el Instituto Universitario de Xeoloxía "Isidro Parga Pondal" de la Universidad de A Coruña y a espeleotemas recogidos durante la realización de esta Tesis, en diferentes salidas al campo del Club Espeleológico A

Trapa (CETRA). Estos han sido recolectados en diversos tipos de cavidades de rocas graníticas (Vidal Romaní & Vaquero, 2007) de diferentes regiones en todos los continentes y procedentes de distintas áreas climáticas: África, Argentina, Australia, Austria, España, Portugal y Suecia, como se muestra en el mapa (Figura 1).

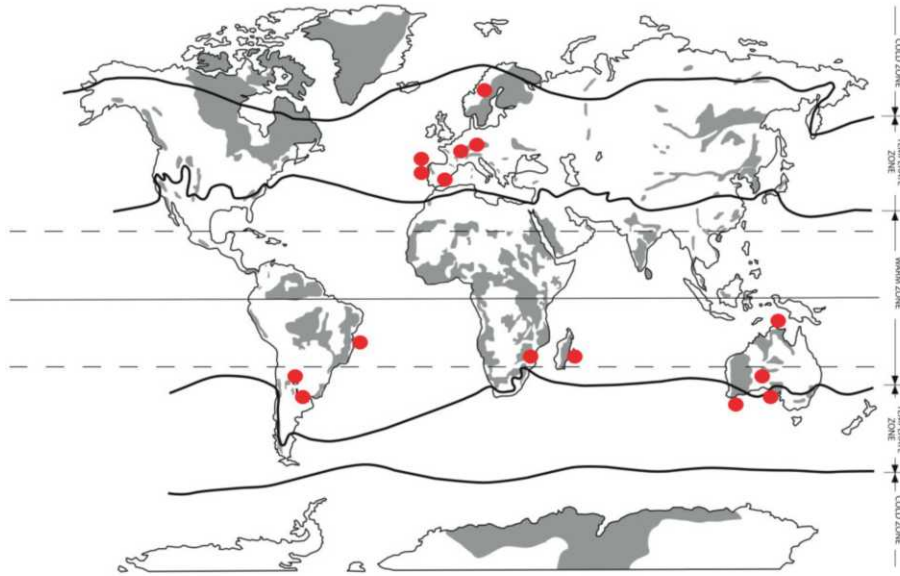


Figura 1. Mapamundi de zonas granitoides del Mundo y áreas muestreadas para el análisis de los espeleotemas en las diferentes regiones climáticas (Vidal Romaní *et al.*, 2015).

3.2.1.1.1. África (Suazilandia, Gobholo)

Esta cueva turística se encuentra orientada de NE a SW en el valle de Gobholo en el noroeste de Swazilandia (Sudáfrica) (Figura 2A) cercana a la capital de Mbabane y está formada por meteorización profunda de agua fluvial que transporta productos a través de granitos antiguos de 2.7 Ga en el Cratón de Kaapvaal. La cueva tiene varias entradas y pasillos más o menos amplios, algunos de ellos accesibles para turistas (Oberender *et al.*, 2015). La biología de esta cueva es muy rica y ya ha sido estudiada anteriormente por Scheuerer *et al.* (2013).

3.2.1.1.2. Argentina (Córdoba y La Rioja)

Las muestras se extrajeron de cuevas de fisura en distintas regiones del país (Vidal Romaní *et al.*, 2010a): Colegio Liqueño, Pampa de Achala, El Zapato, Señor de la Peña y Los Riojanos (Figura 2B).

3.2.1.1.3. Australia

Las cuevas de las que se extrajeron las muestras se encuentran distribuidas en las siguientes regiones de Northern y South Australia (Figura 2C): Tcharkulda Rock, Murphy's Haystacks, Gundaring, Hyden Rock; y han sido anteriormente estudiadas anteriormente desde un punto de vista geomorfológico por Twidale y Vidal Romaní (2005).

3.2.1.1.4. Austria

Las muestras proceden de cuevas de bloques en tubos artificiales sobre gneis en el norte del río Danubio y al sur del Macizo Varisco Bohemio con un río subterráneo en el Norte de Austria y recogidas por Rudolf Pavuza (Naturhistorischen Museum Wien Österreich).

3.2.1.1.5. Suecia

Las cuevas estudiadas son de tipo fisura y se encuentran dispersas en varias regiones: Bodagrottor (Iggesund), Drömgrottan (Sundsvall, Medelpad), Falkberget (Hornsländet, Hälsingland), Fruberget, Hölick Grottan (Hornsländet, Hälsingland), Kvarnberget (Nynäshamn), Pukeberg, Skälboberget (Hudiksvall), Trollhålet (Kullaberg, Skåne), Tjuv-Antes grotta (Nordmaling, Ångermanland), y Töro (Figura 2D).

3.2.1.1.6. España

En España se han estudiado los espeleotemas de numerosas cuevas de diferente tipo a lo largo de las regiones señaladas en el mapa (Figura 3):

3.2.1.1.6.1. Ávila

3.2.1.1.6.2. Córdoba

Las Jaras: Cueva descrita previamente por López Galindo (2013).

3.2.1.1.6.3. Extremadura

Alto de Barruecos, Berrocal del Rugidero y Los Barruecos, cuevas descritas previamente por López Galindo (2013).

3.2.1.1.6.4. Galicia

- Albarellos: cueva de deslizamiento de 430 m de desarrollo horizontal y hasta 33,2 en vertical (Figura 4) (Vaquero & Vidal Romaní, 2014a). Se sitúa en la localidad de Avión (Ourense) y tiene un río subterráneo (Avia) donde predomina la erosión; sin embargo, en zonas donde las fisuras de la roca están resguardadas se desarrollan pequeños espeleotemas.
- A Cunchosa: Cueva de deslizamiento en la costa de Bueu (As Laguelas, Aldán, Pontevedra) con río subterráneo donde existen espeleotemas por encima de las zonas que se inundan esporádicamente (Figura 5).
- Ézaro: Cuevas entre bloques creadas por deslizamientos en O Pindo (A Coruña).
- Fighosa: Esta furna se encuentra en Baredo (Baiona-Galicia).
- Morcegos: Es una cueva de fisura profunda en O Pindo (A Coruña) donde existen numerosos espeleotemas de diferente morfología y mineralogía.
- Porteliña: Cuevas de fisura de 105 m de desarrollo en horizontal y 7 m en vertical (Vaquero & Vidal Romaní, 2014a) con presencia del río Rega en Freixo-Valadares (Vigo).
- A Trapa: Es un grupo de cuevas de bloques con canales del río San Simón con 1526,6 m de desarrollo horizontal y hasta 86,6 en vertical, estudiada más ampliamente desde un punto de vista geológico por Vaquero & Vidal Romaní (2014a).

3.2.1.1.6.5. Huelva

Peña del Hierro, Campofrío, Los Marines, cuevas descritas previamente por López Galindo (2013).

3.2.1.1.7. Portugal

Las muestras se recogieron (Vaquero & Vidal Romaní, 2014) en dos cuevas en la Sima I de "Castelo das Furnas" (Figura 3). Estas se localizan en Castelo de Fião, Monte das Furnas, Boivão (Valença) en Portugal. Su localización es Longitud 8°32' 54.71"W; latitud: 41°59' 44.89"N, cuyo desnivel es de 532 m. Existe circulación subterránea intermitente. En las salas existen bloques acumulados y depósitos con gravas de cuarzo y feldespatos.

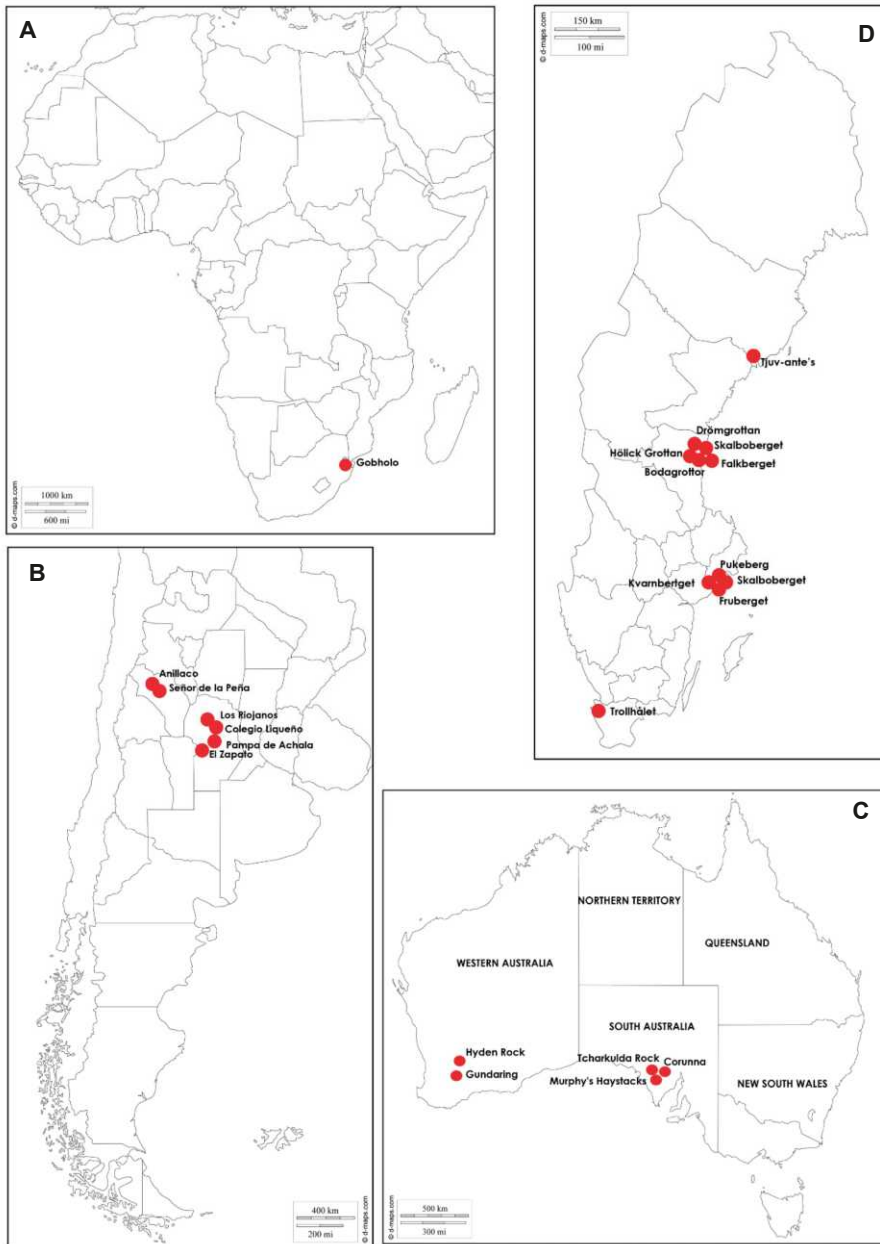


Figura 2. A: Punto de muestreo en cuevas de África. B: Puntos de muestreo en cuevas de Argentina. C: Punto de muestreo en cuevas de Australia. D: Puntos de muestreo en cuevas de Suecia (Vidal Romani, *et al.*, 2015).

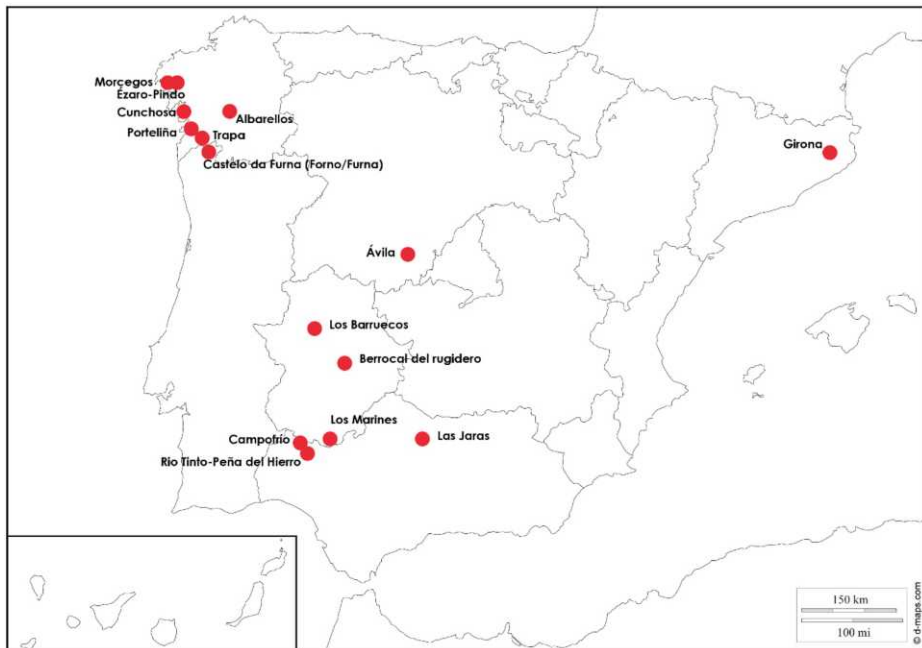


Figura 3. Punto de muestreo en cuevas de la Península Ibérica (Vidal Romaní *et al.*, 2015).

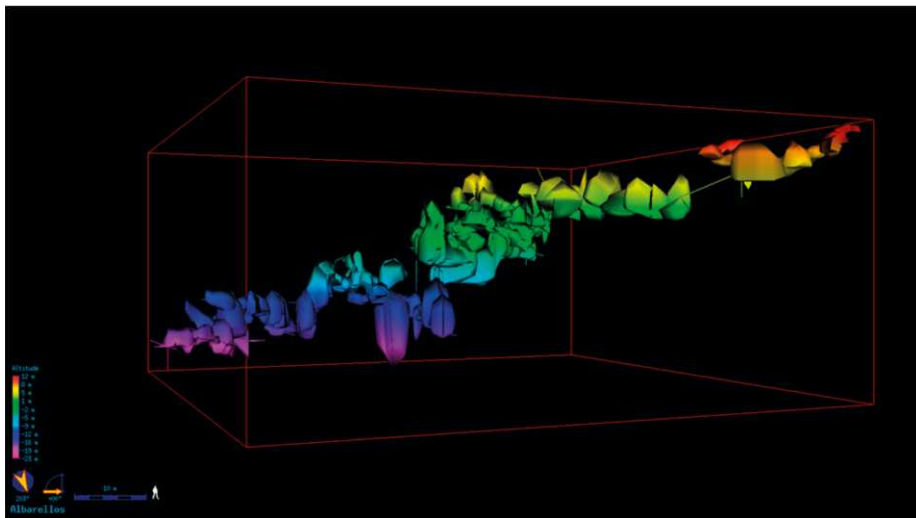


Figura 4. Mapa topográfico de la cueva de Albarellos, Ourense, Galicia, España (Vaquero & Vidal Romaní, 2014).

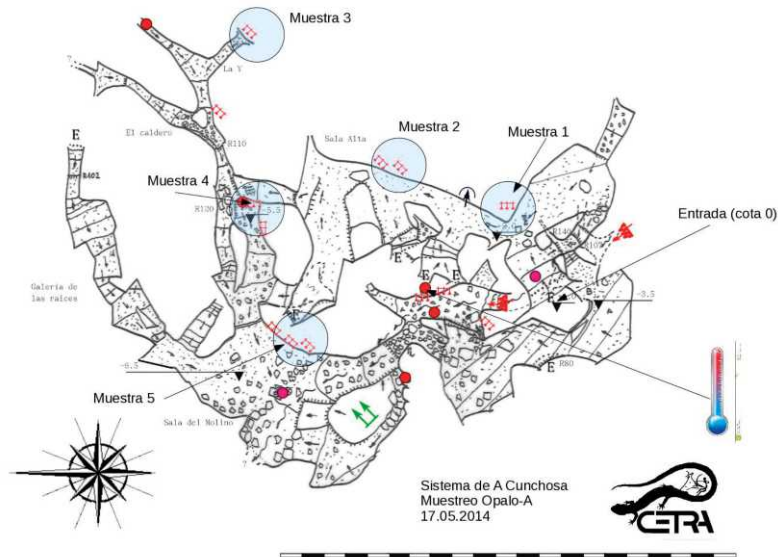


Figura 5. Mapa topográfico de la cueva "A Cunchosa" y toma de muestras, Pontevedra, Galicia, España (Vaquero & Vidal Romaní, 2014).

3.2.1.2. Toma de muestras

Las muestras son espeleotemas de pequeñas dimensiones recogidos en diferentes salidas al campo del Club Espeleológico A Trapa (CETRA) a lo largo de la cueva, bajo condiciones particulares de luz o humedad, diferenciando techo, suelo o pared. Las muestras se transportaron en unas condiciones idóneas para su conservación convenientemente protegidas en bolsas, cajas o botes esterilizados, dependiendo del tipo de estudio al que fueran a ser sometidas; y según su fragilidad y dimensiones, para evitar cualquier tipo de deterioro físico o contaminación durante el transporte al laboratorio. Además se etiquetaron correctamente con la localidad, la procedencia geográfica de la muestra y su entorno, así como la situación meteorológica de la zona en la temporada de muestreo.

3.3. TRABAJO DE LABORATORIO

3.3.1. Microscopía Óptica

El análisis morfológico de las muestras se realizó mediante microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500, acoplado a una cámara Nikon DS-Fi1 para realizar fotografías de las muestras con el software Nikon Nis-Elements F 3.0. Este procedimiento permite observar la superficie de las muestras en su color natural y ampliar su observación hasta el límite inferior del MEB. Debido a la imposibilidad de observar muestras de gran tamaño con el MEB con esta técnica se seleccionaron las áreas más interesantes para su posterior estudio a mayor escala.

3.3.2. Microscopía Electrónica de Barrido con Energía Dispersiva (EDS)

Para la observación de las muestras bajo esta técnica, primeramente se procedió a su almacenaje en un desecador hermético de sílica-gel, al menos cinco días, con el fin de eliminar el exceso de humedad de las muestras y evitar la producción de artefactos que podrían sufrir las muestras con la subsiguiente deshidratación en punto crítico, previa a la metalización que permite su visión bajo esta técnica. Un ejemplo de este artefacto es la fracturación poligonal del hidrogel de silicio u ópalo-A precipitado. Después de este paso previo, se realizó la deshidratación en punto crítico con el equipo BAL-TEC CPD 030 y las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro de 50-100 Å mediante el equipo de pulverización catódica BAL-TEC SCD 004. Finalmente se observaron bajo el MEB modelo JEOL JSM 6400. Para la realización de las fotos se utilizó el software INCA. Se realizaron desplazamientos aleatorios en una cuadrícula imaginaria realizando movimientos en horizontal y vertical sobre toda la sobre la superficie del espeleotema, tanto con el microscopio estereoscópico como con el microscopio de barrido, para tener una visión general de la composición de los espeleotemas.

Con este procedimiento se obtuvo una visión, en detalle, de la superficie de los organismos que se sitúan sobre el espeleotema y de los materiales minerales que se encuentran en su superficie mezclados con los restos detríticos.

Además, las dimensiones de los organismos en las micrografías de microscopía electrónica de barrido fueron medidas mediante el programa IMAGEJ.

Adicionalmente, se realizaron análisis elementales semicuantitativos con el MEB mediante espectrometría de rayos X de energía dispersada (EDS), para conocer la composición de los elementos de los minerales y nanocristales encontrados en las muestras. A partir de este análisis, se obtuvieron tablas de porcentaje de elementos combinados con el oxígeno y gráficas de abundancia de los correspondientes elementos en las muestras, que fueron procesadas con el software INCA.

3.3.3. Difracción de Rayos-X

Para su estudio químico y mineralógico se realizaron análisis de Difracción de rayos X de muestras polvo y sólidos policristalinos. Las muestras de espeleotemas se pulverizaron hasta obtener una muestra compuesta de granos finos de material policristalino (tamaño de grano $< 50 \mu\text{m}$), mediante un molino de bolas marca Retsch modelo PM400. De cada muestra, fueron sometidos al análisis de difracción de Rayos-X, 5 gramos con el equipo SIEMENS XRay diffractometer D5000 que dispone de un tubo de rayos X de Cu (longitud de onda: 1,54 angstroms). Finalmente, la identificación de los minerales se realizó comparando el difractograma de la muestra (posiciones, anchuras e intensidades de los picos) con los patrones experimentales almacenados en una base de datos de difracción de polvo (JCPDS-PDF 2).

Las técnicas de microscopía y análisis estructural se realizaron en la Unidad de Microscopía y de Análisis Estructural de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña.

3.3.4. Técnicas de Biología molecular

Se realizó una primera aproximación al estudio de los microorganismos que forman los espeleotemas desde el punto de vista genético aplicando a los depósitos técnicas de biología molecular. En contraposición a la mayor parte de los trabajos publicados, donde las técnicas se aplican a organismos vivos, se aplicó 16S metabarcoding de bacterias y arqueas a los espeleotemas de una de las cuevas descritas, según el procedimiento siguiente:

3.3.4.1. Aislamiento del ADN

El ADN fue extraído por AllGenetics & Biology, S.L. de los espeleotemas provenientes de dos cuevas de fisura (Vidal Romaní & Vaquero, 2007) en Boivão, Norte de Portugal: “A Furna” (Figura 6), la más larga y “O Forno” (Figura 7) la más corta. Estas

no reciben otras aportaciones de agua más que las proporcionadas por la infiltración de la lluvia desde el exterior o por condensación de la humedad ambiental de la cueva. Con excepción de las muestras tomadas en la boca de la cueva de O Forno, el resto de las muestras estudiadas en ambas cuevas, están permanentemente en situación de oscuridad total. Las cuevas están, la mayor parte del tiempo, libres de visitas y solo ocasionalmente entran en ellas deportistas (espeleólogos) en grupos poco numerosos (2 ó 3 individuos). En la cueva más grande (A Furna), existe una población estable de quirópteros poco abundante (10 individuos máximo).

Las muestras (7 espeleotemas cilíndricos) se tomaron, bajo condiciones estériles para evitar contaminación con ADN exógeno, del techo de las cavidades y en diferentes puntos a lo largo de la cueva, con el fin de obtener la mayor información de los diferentes ambientes existentes. Sus dimensiones fueron: alrededor de 15 mm de largo y 1 mm de ancho. En la cavidad “A Furna” se analizaron 3 muestras, dos de ellas en el fondo de la cueva (C1 y C2) y la tercera en una zona intermedia más próxima al exterior (C3). De “O Forno” se estudiaron 4 muestras en distintos puntos de la cueva, desde su entrada hasta el fondo: A1, A2, A3 y A4.

Las muestras fueron refrigeradas durante su transporte al laboratorio donde inmediatamente fue aislado su ADN, después de pulverizar los espeleotemas con material estéril y mediante el uso de los reactivos proporcionados en el PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) siguiendo las instrucciones de uso.

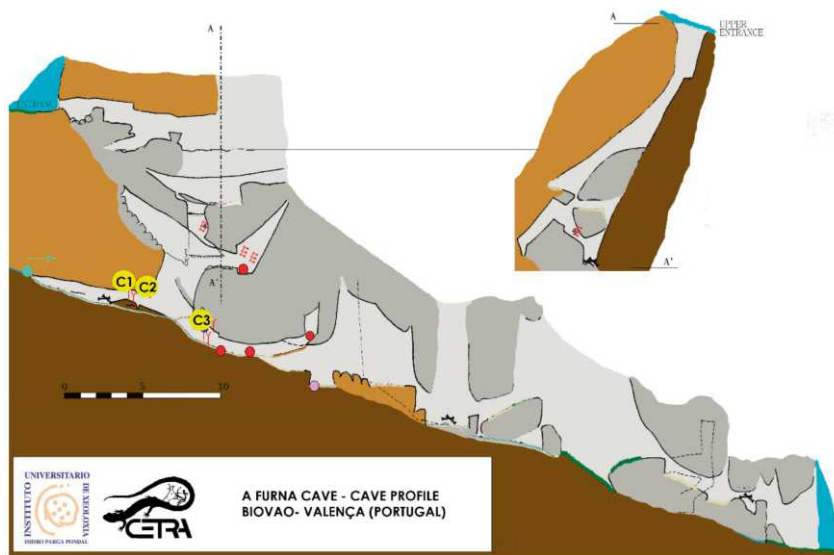


Figura 6. Mapa topográfico de perfil y puntos de muestreo de la cueva "A Furna", Castelo da Furna, Portugal. Portugal, (datos facilitados por Marcos Vaqueiro Rodríguez).

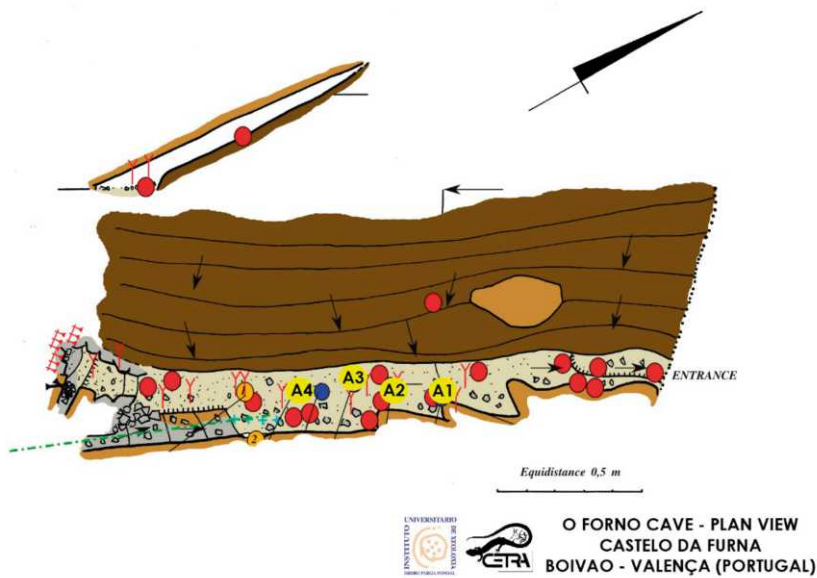


Figura 7. Mapa topográfico y puntos de muestreo de la cueva "O Forno", Castelo da Furna, Portugal, Portugal (datos facilitados por Marcos Vaqueiro Rodríguez).

3.3.4.2. Amplificación del ARN 16S

Se amplificó un fragmente del ARN ribosomal 16S de alrededor de 530 pares de bases utilizando los siguientes primers: S D Bact 0341 b S 17 (5' CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') y S D Bact 0785 a A 21 (5' GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3') (Herlemann *et al.*, 2011). En cada muestra se utilizó un marcador oligonucleotídico diferente en el *primer-forward* con el fin de diferenciar las lecturas correspondientes a cada una de las muestras tras su secuenciación.

Durante la extracción del ADN se realizó un control negativo, tratado como el resto de muestras, con el fin de detectar potenciales contaminaciones bacterianas.

Cada PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 100 µL, conteniendo 10 µL de ADN modelo, 200 µM de cada dNTP (Roche), 0,5 µM de cada primer, 2 U de DNA polymerase de Alta-Fidelidad (*Thermo Scientific*), 20 µL de 5x *Phusion HF Buffer* (*Thermo Scientific*) y agua ultrapura hasta 100 µL. La mezcla fue incubada en un iCycler iQ (BioRad) para una desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, seguida de 35 ciclos a 98 °C, durante 10 s, 55 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s y finalmente la fase de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de la PCR fueron llevados a un gel de agarosa 1 % marcado con *REAL Safe* (Durviz), y fotografiado bajo luz ultravioleta. Además han sido purificados usando el *PCRExtract Mini Kit (5 Prime)*, según las instrucciones aportadas por el fabricante.

3.3.4.3. Secuenciación FLX-454

Las secuencias amplificadas fueron sometidas a una pirosecuenciación de alto rendimiento en un secuenciador Roche FLX-454 utilizando la mitad de la placa. Según las recomendaciones del fabricante para los análisis con metabarcoding, el diseño experimental seleccionado, permite la lectura de la secuenciación del amplicón en un solo sentido para aumentar el número de lecturas unidireccionales por amplicón.

3.3.5. Análisis bioinformáticos

Estos análisis permitieron analizar la calidad y el tamaño de las lecturas, seleccionando sólo las que cumplan los estándares de calidad y tamaño. Después de esto se procedió a realizar las lecturas sin ruido y se eliminaron las quimeras. Finalmente, las lecturas se clasificaron según su similitud asignándose un grupo

taxonómico. El objetivo fue ver las diferencias y similitudes en términos de biodiversidad entre las muestras de los diferentes entornos de la cueva, dado que por la naturaleza del método, los resultados en cuanto a abundancia sólo serán significativos en términos relativos entre las muestras. Esto es debido a la amplificación del material genético mediante las PCRs que hace que la abundancia de los resultados esté afectada por la eficiencia de la reacción para cada especie identificada.

3.3.5.1. Qiime 1.7.0

Las secuencias obtenidas de FLX-454 fueron procesadas por AllGenetics & Biology, S.L., usando Qiime 1.7.0 (Caporaso *et al.*, 2010) bajo los parámetros por defecto indicados. Ambos *primers* (*reverse* y *forward*) fueron eliminados de cada secuencia. Las secuencias más cortas que 250 pares de bases y más largas que 1000 pares de bases fueron excluidas del análisis. La máxima longitud permitida del homopolímero fue 6 y la mínima calidad permitida para cada secuencia de 25.

Las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se obtuvieron usando cd-hit (Li & Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012) con valores de distancia genética estándar de 0,97. Además, se llevó a cabo una etapa de filtrado previo, con el fin de agrupar secuencias que eran idénticas en sus 100 primeros pares de bases, antes de la obtención de los OTUs. Una vez que los OTUs fueron recogidos, la secuencia más frecuente de cada OTU fue elegido como representante. Los OTUs presentes en la muestra del blanco fueron excluidos de los análisis posteriores.

La taxonomía ha sido asignada utilizando Blast (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos *Greengenes* de mayo de 2013 disponible en <http://greengenes.lbl.gov>.

3.3.5.2. SILVAngs 1.2

Además, se realizó otro análisis bioinformático bajo la supervisión de la Dr. Natuschka Lee en una estancia realizada en el *Lab Microbial Systems Ecology* en la *Technische Universität München (TUM)*. En este caso las secuencias, previamente eliminados los primers, fueron procesadas a través de SILVAngs 1.2 (Quast *et al.*, 2013). Cada secuencia fue alineada mediante el *SILVA Incremental Aligner* SINA SINA v1.2.10 para ARB SVN (revisión 21008) (Pruesse *et al.*, 2012) contra el SILVA SSU rRNA SEED y sometida a un control de calidad (Quast *et al.*, 2013). Las secuencias alineadas con menos de 50 nucleótidos y con más del 2% de ambigüedades, o 2% de

homopolímeros respectivamente fueron excluidas de los siguientes procesos. Las contaminaciones putativas, artefactos, secuencias con una baja calidad de alineamiento (50 de identidad de alineación, con 40 de puntuación de alineamiento según SINA), también fueron identificadas y excluidas de análisis.

Después de estos pasos iniciales de control de calidad, fueron identificadas las secuencias idénticas (dereplicación), las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) por muestra y las secuencias de referencia de cada OTU. La dereplicación y el *clustering* se realizaron usando *cd-hit-est* (version 3.1.2; <http://www.bioinformatics.org/cd-hit>) (Li & Godzik, 2006), ejecutándolo de la forma más fiable, haciendo caso omiso de dispersiones, y mediante la aplicación de criterios de identidad de 1,00 y 0,98, respectivamente. La clasificación se realizó por búsqueda en BLAST contra la versión no redundante de SILVA SSU Ref dataset (release 119.1; <http://www.arb-silva.de>) usando *blastn* (version 2.2.30+; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con los ajustes estándares (Camacho *et al.*, 2009).

La clasificación de cada secuencia OTU de referencia fue mapeada en todas las secuencias y fueron asignados al OTU respectivo. Esto nos permite obtener información cuantitativa (número de secuencias individuales por taxón), entre las limitaciones de la PCR y de los sesgos de las técnicas de secuenciación, además de los operones múltiples de ARNr. Las secuencias con *BLAST hits* débiles o sin ellos, donde la función “(% secuencia de identidad + % cobertura de alineamiento)/2” no excedía 93, permanecieron no clasificadas y estas secuencias fueron asignadas al metagrupo de “No clasificadas”.

La naturaleza biológica (Vidal Romaní *et al.*, 2010b) de estos bioespeleotemas, en contraposición al resto de espeleotemas estudiados en cuevas, nos garantiza el éxito en este método de secuenciación. A pesar de estar analizando sedimentos, existe una cantidad suficiente de biomasa que permite caracterizar los organismos presentes que forman activamente el espeleotema. Por lo que este método ha sido utilizado con éxito.

3.4. TRABAJO DE GABINETE

El trabajo realizado en gabinete consistió en una revisión bibliográfica de trabajos relativos, por una parte, al estudio de la microbiota en diferentes tipos de cuevas y, por

otra, al estudio de los espeleotemas presentes en ellas; así como otros trabajos relacionados con la química del silicio. Este trabajo también constó del análisis de los resultados obtenidos, interpretación y discusión.

Las observaciones realizadas tanto en el trabajo de campo como las interpretaciones de los datos recogidos en el laboratorio, han permitido la elaboración de las descripciones de los depósitos, así como la enumeración de los procesos de formación de los mismos y la elaboración del resto de conclusiones del trabajo. Además, revisar la bibliografía pasada ha ayudado a corregir errores y a realizar modificaciones en los modelos previos descritos por en la bibliografía.

Capítulo 4

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En esta tesis doctoral los elementos de estudio de las cuevas son los depósitos o espeleotemas. Su análisis mediante microscopía óptica y electrónica de barrido ha permitido obtener los siguientes resultados:

4.1.1. Morfología

4.1.1.1. Espeleotemas cilíndricos Individualizados:

Estos espeleotemas están asociados a lentos movimientos de agua que permiten su desarrollo independientemente de la gravedad, en pared, techo y suelo de la cavidad (Figura 1). Son muy finos (hasta 4 mm de diámetro) y de forma cilíndrica, llegando a tener desarrollos longitudinales en forma de maza de 4 a 15 mm (Figura 2). Algunos tienen una textura más compacta (Figura 3) y otros más porosa (Figura 4). Algunos presentan colores claros (Figuras 5-6) y otros son más detríticos y oscuros (Figura 7).

Hacia el extremo, a veces, se aprecia ópalo A de textura más lisa y cementada (Figuras 8-9). Se ha visto que las zonas cementadas por ópalo A pueden presentar grietas de desecación debido a la deshidratación sufrida durante el proceso de metalización de la muestra para su observación al MEB (Figuras 10-11); por lo que, en este caso, se trata de un artefacto y no de una característica natural del depósito.

En ocasiones, el extremo del espeleotema se abre presentando una morfología fungiforme (Figuras 12-14) con un cuerpo cilíndrico corto y estrecho de 1-2 mm de ancho y 4 mm de alto, que termina en un gran sombrero semicircular de 4 mm de ancho (Figura 15) y que puede estar casi totalmente compuesto por maclas de yeso (Figuras 16-18) y, en ocasiones, cristales de anhidrita (Figuras 19-20) que les da un color blanco (Figuras 21-23).

4.1.1.1.1. De techo:

Formados en la parte superior de las fisuras de las rocas (el techo de las cuevas o aleros de las cavidades) cuando el peso de la gota de agua sobrepasa la tensión superficial (cuando se produce goteo) (Figura 24). Normalmente se desarrollan como formas alargadas e individuales que desarrollan lepisferas de yeso en su extremo.

4.1.1.1.2. De suelo:

Están formados por precipitación de las sustancias disueltas y/o arrastradas por el agua que entra en la cueva a través de fisuras en sus paredes. Corresponden siempre a flujos lentos limitados por el umbral sedimentario erosión/acumulación que a su vez determina la participación de los microorganismos en el crecimiento del espeleotema (Figura 25).

4.1.1.2. Espeleotemas cilíndricos en césped:

Compuestos por asociaciones de varias unidades de finos espeleotemas cilíndricos (máximo 1 mm) y situados indistintamente en techo, paredes o incluso el suelo de la cavidad (Figuras 26-28). Crecen gracias a movimientos capilares del agua a través de la masa de clastos aglomerados. Normalmente desarrollan lepisferas de yeso o cristallitos maclados de calcita en sus extremos. La matriz de sedimento es normalmente ópalo-A.

4.1.1.3. Espeleotemas planares o flowstone:

Son recubrimientos continuos de la superficie de la roca de espesor variable (1 μm) que llegan a esconder sus microrrugosidades (Figura 29) y que a veces dejan entrever la roca incipiente (Figura 30). Tienen diferentes colores: beige, marrón, grisáceo, blanco (Figura 31), verdoso (Figura 32) o incluso rojizo (Figuras 33-35) que corresponden a granos de cuarzo, feldespato, mica, anfíbol y piroxeno. Esta textura detrítica en el MEB se aprecia como granos compactados y cementados por ópalo A (Figuras 36-37) y los acúmulos de color blanquecino, vistos a mayor aumento, son maclas de cristales de yeso (Figuras 38-39) o crecimientos biológicos (Figuras 40-41). A simple vista estos depósitos muestran un aspecto arenoso y bajo el microscopio estereoscópico tienen una textura detrítica con una matriz polimineral de pequeños clastos minerales angulosos (Figuras 42-43). Estos son producidos primero por meteorización de la roca provocada por el agua que se infiltra entre los planos de discontinuidad (diaclasas y fracturación) y seguidamente son movilizados cortas distancias por el agua sobre la superficie rocosa, empujando delante de ella estos clastos durante sus etapas de circulación (*slurry*), las cuales no siempre quedan registradas, creando una superficie lisa y un recubrimiento continuo. El agua en este caso se mueve arrastrando los granos minerales, primeramente como pequeñas láminas y después, cuando el flujo de agua decrece y la evaporación comienza, la tensión superficial produce su división en gotas (Figura 44); las cuales, se adhieren al techo, paredes o suelo de la cueva e incluso a los bordes rocosos (efecto borde)

(Figuras 45) aglomerando y cementando los granos minerales alrededor de las mismas. El resultado final es una red intrincada de campos de microgours (Figuras 46-54).

4.1.1.3.1. Microgours:

Son superficies imbricadas cuyos bordes en ocasiones se alargan en la dirección del flujo de agua, cuando existe una dirección preferente de movimiento para esta (Figura 55). La clave de la sedimentación de estas formas, es la lenta velocidad del movimiento de la lámina de agua, que no sobrepasa la fuerza de adhesión de los granos o *slurry* a la superficie rocosa sobre la que se desplaza (Vidal Romaní *et al.*, 1997, 1998a, 1998b, 2015). Así los avances de la lámina de agua durante las fases húmedas, quedan señalados por acumulaciones lineales con patrones de desarrollo sinuoso, que indican el modo en el que se ha movilizó el agua. Según en qué zona de la cueva se formen: pared (Figuras 56), techo (Figuras 57-58) o suelo (Figuras 59-60), tendrán un aspecto diferente. Esto es debido a la distinta velocidad a la que se moviliza el agua, siendo mayor en las superficies inclinadas. Los patrones más irregulares de los campos de microgour coinciden con los asociados al techo. En estos casos, las acumulaciones de granos detríticos tienen un patrón similar al de las texturas *foam-like* (Figuras 61-62) de los granos de arena arrastrados por las olas en la parte alta de la playa; donde el agua mueve pendiente arriba partículas de arena más pequeñas hasta que, al infiltrarse en el sustrato poroso de la playa, quedan dispersos los granos de arena con una acumulación característica de huecos y bordes. Los desarrollados en el suelo muestran un patrón más homogéneo (Figura 60), con líneas sinuosas regularmente espaciadas y dependientes de las características del flujo del agua. En otras ocasiones, tienen formas con más sinuosidades “folia” parecidas a las descritas por Audra *et al.* (2009) (Figura 63).

4.1.1.4. Estromatolitos:

En su aspecto externo destacan por su tamaño (5 mm de ancho y hasta 15 mm de longitud) y color grisáceo (Figura 64). En sección longitudinal (Figura 64) y transversal (Figuras 65-70) puede constatar su crecimiento en capas rítmicas (Figura 71), que en la base presentan coloraciones claras (blancas, grisáceas y beige) y, a medida que crece el espeleotema se capas más oscuras (marrones a rojizas y amarillas) (Figura 72-73).

Externamente también se ha encontrado que existe una transición de diferentes texturas de base a punta del espeleotema. Hacia la base se encuentra una zona más porosa donde se entremezclan clastos y mayor densidad de microorganismos filamentosos. Existiendo en el extremo una lámina lisa de ópalo A que se solapa con la punta del espeleotema donde crecen las maclas de yeso (Figuras 74-75).

4.1.2. Sedimentología

Las características sedimentológicas generales de los espeleotemas de cuevas de rocas félsicas (granitoides), cuando se estudian con el Microscopio Estereoscópico (ME) o el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), permite caracterizarlas como depósitos granulares de fábrica abierta (open work). Se acumulan en techo, paredes o suelo de las cavidades y en cantidades discretas (nunca forman acumulaciones superiores a algunos metros en superficie ni se acumulan en espesores superiores a unos centímetros). Los elementos de fábrica de estos espeleotemas pueden ser de tres tipos:

- **Minerales heredados:** proceden de la desagregación de la roca base realizada por meteorización física y química relacionada con la humedad de la cavidad.
- **Biológicos:** son organismos intactos o fragmentos de ellos y que corresponden a las formas de vida que desarrollan parte, o la totalidad de su ciclo vital en el interior de esas cavidades.
- **Biominales autigénicos amorfos y cristalinos:** formados por la interacción del sustrato mineral y los productos metabólicos de la actividad orgánica. Pueden ser minerales autigénicos idiomorfos, que crecen en los poros del espeleotema por concentración, debida a la evaporación del agua retenida en el espeleotema; o mineraloides amorfos, sin morfología cristalina y que se acumulan en masas con estructura rítmica (estructura varvada) y cuya única morfología se debe a su adaptación al sustrato sobre el que se depositan. Existe una relación genética, en algunos casos, entre mineraloides y minerales autigénicos, pudiéndose considerar que los primeros (mineraloides) son la base de crecimiento de los segundos (microminerales de yeso).

4.1.3. Mineralogía

4.1.3.1. Biominerales autigénicos amorfos (mineraloides)

La especie mineral más frecuente en las cuevas de rocas félsicas es el ópalo A u ópalo amorfo ($\text{SiO}_2 \cdot 15(\text{H}_2\text{O})$), también llamado ópalo biogénico. Es un mineral amorfo formado por la disolución del silicio existente en la roca base. Cuando el agua se evapora, se produce una concentración de elementos, principalmente del Si, induciendo la formación del hidrogel de Si (Figuras 76-77). El aspecto de este hidrogel examinado al microscopio estereoscópico, es una fina capa con brillo resinoso y transparente que recubre la matriz de clastos poliminerale de diferentes colores (Figuras 78-79).

La morfología de este mineral no es propia, porque se adapta a la superficie donde se deposita. Sin embargo, lo más interesante en la formación de este mineral, es que en su etapa final previa a su consolidación, sirve de ambiente de nucleación y crecimiento de los minerales autigénicos (se enumeran a continuación).

4.1.3.2. Biominerales autigénicos cristalinos

Estos cristales se forman durante el crecimiento del espeleotema, y en el propio cuerpo de este. Son, por tanto, minerales de neoformación, típicos de las condiciones ambientales de la cueva (humedad y temperatura). Se forman por precipitación a partir de los elementos químicos disueltos en el agua y, a veces, ésta se incorpora a la estructura del mineral como agua de hidratación. Este crecimiento puede tener lugar en superficie, en pequeñas gotas que crecen en los ápices de los espeleotemas cilíndricos de techo o bien en las acumulaciones que se forman en los espeleotemas de suelo. En otros casos, crecerán en el interior de los poros del espeleotema. Este agua contiene ciertos elementos químicos (Si, Al, K, Fe, Na, etc.), con predominio del Si para el caso de las cuevas de rocas félsicas. Estos elementos en disolución, se van concentrando a medida que se produce la evaporación del agua, en las etapas de menos aportes hídricos al sistema subterráneo. Esto hace que paulatinamente se pase a un agua con un contenido creciente en Si y, finalmente a un hidrogel de Si. El hidrogel de Si se ha demostrado experimentalmente, que es un medio de cristalización muy favorable para la formación de los minerales autigénicos cristalinos (carbonatos, sulfatos, halogenuros, etc.) encontrados en cuevas de rocas félsicas. El papel del gel o hidrogel de Si es precisamente éste: conseguir la precipitación de estructuras cristalinas de baja temperatura, en condiciones de dilución a las que sería imposible en condiciones normales.

Una de las características comunes a este tipo de minerales es su gran idiomorfía, lo que facilita su identificación al poder asociarse su composición elemental, obtenida por la difracción de electrones retrodispersados, con su simetría externa. Estos minerales al tratarse, en la mayoría de los casos, de formas cristalinas pertenecientes a los sistemas de más baja simetría (monoclínico, rómbico y trigonal) presentan la aparente variabilidad morfológica que corresponde a estos sistemas. Son habituales formas aciculares, prismáticas, piramidales, etc., habitualmente macladas (maclas centradas, polisintéticas, biáxicas, de adosamiento y penetración).

4.1.3.2.1. Microcristales de sulfato cálcico (yeso y anhidrita)

Se trata de los minerales autigénicos más generalizados en los espeleotemas de cuevas de rocas félsicas. Debido a la baja energía de cristalización de este mineral, su presencia es habitual en los espeleotemas y se producen a partir del gel o hidrogel de Si. En todos los casos, las cristalizaciones de esta especie mineral son idiomorfas y se presentan como maclas de diversos tipos (adosamiento, penetración, radiales, biáxicas); siendo en unos casos la forma externa de las maclas libre o adoptando la forma externa de la gota en la que se ha producido la cristalización: gotas hemisféricas, elipsoidales para el caso de espeleotemas de techo (Figuras 24, 80-82) (Onac *et al.*, 2014), y gotas oblongas planares para el caso de espeleotemas de suelo (flowstone) (Figura 38). A veces también es posible ver la típica macla en punta de lanza del yeso (Figura 83).

4.1.3.2.2. Microcristales de halita

Son cristales con forma cúbica de 4 μm de arista y composición química NaCl. Aunque son poco frecuentes, han aparecido casos de microcristales de halita en el sistema poroso del espeleotema (Figura 84) (Vidal Romaní *et al.*, 2013).

4.1.3.2.3. Microcristales de calcita

Presentan una morfología acicular prismática (Figuras 85-86) y no existe una clara relación entre la base de hidrogel de silicio, como ocurre en las cuevas desarrolladas en rocas félsicas, al ser minoritaria o muy reducida la presencia del gel de silicio en las cuevas desarrolladas en rocas máficas y ultramáficas. La interpretación más generalizada para este tipo de minerales, es que se producen por un efecto similar al

de sumidero de CO₂ atribuido a las rocas máficas y ultramáficas; aunque algunos autores (Woo *et al.*, 2008) los atribuyen a la disolución de carbonatos acumulados en el exterior de las cavidades e infiltrados hasta el interior de estas.

4.1.4. Biología

En la tabla 1 se resume la abundancia relativa de los elementos encontrados en los espeleotemas en todas las muestras extraídas de cuevas graníticas de todo el mundo, pertenecientes a regiones bioclimáticas muy diferentes. Sorprendentemente, todas ellas presentan el mismo patrón biológico y sedimentario, lo que sugiere la estabilidad y homogeneidad de condiciones ambientales dentro de este tipo de cuevas.

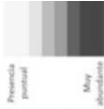


Tabla 1. Biodiversidad y abundancia de organismos en los espeleotemas estudiados.

A continuación, describiremos en detalle los organismos encontrados sobre los depósitos.

4.1.4.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares ubicuos que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros y diversas formas (Figuras 87-88). Gracias al estudio de la superficie de los espeleotemas al MEB se han podido identificar una gran variedad de bacterias con distintas morfologías:

- Cocos individuales de 1-5 μm de diámetro y formando tétradas (Figuras 88-90) tanto de superficie lisa como rugosa (Figuras 91-95).
- Estafilococos (Figuras 96-98), algunos en forma de rosario (Figura 99).
- Filamentos (Figuras 100-116) tanto lisos como rugosos, a veces constreñidos (Figuras 117-120) y que pueden llegar a formar grandes entramados que cubren toda la superficie del depósito (Figuras 121-127). Algunos de ellos (2 μm de ancho) (Figura 128) probablemente cianobacterias filamentosas con acinetos, pertenecientes al género *Anabaena* (Figuras 129-130).
- Streptobacilos a veces con superficie rugosa de 2,5 μm de largo y 1 μm de ancho.
- Espiroquetas, filamentos con morfología helicoidal (Figura 131) que podrían corresponderse con el género *Ancyclobacter* (Figuras 132-134).
- Fusiformes (Figuras 135-138) como las encontradas por López-Arce & García-Guinea (2005).

Debido a la naturaleza de la técnica utilizada para clasificar estos organismos según su morfología (MEB) es imposible clasificarlos taxonómicamente; sin embargo, y debido a la aplicación de técnicas de biología molecular (detalladas más adelante) y a la bibliografía existente, se ha sabido que estos microorganismos pertenecen tanto a los dominios Bacteria como Archaea. Siendo los filos de bacterias más abundantes: *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* y *Acidobacteria*. Además, es muy probable que estas diferentes morfologías pertenezcan, en ocasiones, al mismo microorganismo en las diferentes fases de su ciclo vital (crecimiento, esporulación y germinación) (Figuras 139-148). Este es el caso de *Streptomyces* (Figura 149) o *Actinomyces*, que son los géneros más representativos de las actinobacterias, bacterias gram positivas que presentan la mayor abundancia en estos depósitos.

4.1.4.2. Hongos

Los hongos constituyen un gran grupo de organismos pluricelulares, diverso y muy extendido, que incluye a los mohos y las levaduras, que son unicelulares. Tienen hábitats muy diversos y cumplen una importante función en la mineralización del carbono orgánico. Sin embargo, la mayoría de los hongos son terrestres y habitan en el suelo o en materia vegetal muerta. Un gran número de hongos son parásitos de plantas, pero también pueden establecer asociaciones simbióticas con muchas plantas, facilitándole a la planta la adquisición de minerales del suelo. En los espeleotemas estudiados los hongos están presentes, pero no son demasiado abundantes. Esto es debido a las condiciones ambientales de la cueva donde no existen plantas, sobre las que desarrollarse como simbióticos, mutualistas o patógenos; y tampoco demasiada materia orgánica sobre la que ejercer como saprofitos (son ambientes oligotrofos). Sin embargo, son organismos cruciales en los ecosistemas cavernícolas por su papel de descomponedores y parásitos. Estos organismos tienen esporas que son movilizadas por corrientes de aire o por animales, como artrópodos, murciélagos o humanos (Pusz *et al.*, 2014).

Estos organismos forman un entramado de filamentos denominados hifas. Las hifas están formadas por paredes celulares tubulares que rodean la membrana citoplasmática y a menudo están septadas. Cada filamento de una hifa crece fundamentalmente por su extremo, por extensión de la célula terminal (Figura 150). Las hifas habitualmente crecen juntas sobre una superficie y forman ovillos compactos, denominados colectivamente micelio, estos se han observado en ocasiones sobre la superficie de los espeleotemas. A partir del tapiz micelial, algunas hifas pueden formar ramas que se extienden hacia arriba más allá de la superficie, y es sobre estas hifas aéreas, donde se forman las esporas denominadas conidios. Los conidios son esporas asexuales (su formación no implica ni fusión de gametos ni meiosis) y son resistentes a la desecación. En las muestras estudiadas muchos de los restos y estructuras filamentosas que se aprecian podrían ser hifas de hongos (Figura 151) e incluso se han visto multitud de conidios y basidios (Figuras 152-155). De la misma forma, también se han encontrado uredósporas (Figura 156) de hongos *Basidiomycetes* (Figuras 157-158), posiblemente pertenecientes a la roya del eucalipto, y de *Ascomycetes* en multitud de muestras (Figuras 159-161).

Con el microscopio estereoscópico también se aprecian, entre las sinuosidades de los depósitos, restos biológicos de color blanquecino (Figura 162) y otras acumulaciones

verde esmeralda de aspecto lanudo (Figura 163), que también podrían ser micelios de hongos.

4.1.4.3. Amebas testáceas

Las amebas son protozoos u organismos unicelulares que viven protegidos por una testa tanto en los ambientes subaéreos como subterráneos. La testa puede estar formada por secreciones de tipo proteínico o placas de calcita y sílice amorfa (idiosomas) (Figura 164); o en los casos de amebas aglutinantes (con exosomas), por partículas minerales u orgánicas que son: granos de polen, placas de otras amebas y restos de otros microorganismos (diatomeas, colémbolos, etc.). Las amebas con testas de ópalo amorfo son habituales en ambientes de pH ácido con alto contenido en materia orgánica, lo que explica su presencia en cavidades desarrolladas en rocas ígneas donde se cumplen ambos requisitos.

Las amebas testáceas son mayormente organismos fagotróficos con algunas excepciones mixotróficas y algunas especies fotótrofas (Gilbert *et al.*, 2000; Wilkinson & Smith, 2006). Las fagotróficas normalmente se alimentan de hongos, grandes protozoos, otras amebas testáceas pequeñas, amebas desnudas, algas y metazoos pequeños tales como rotíferos y nematodos; pudiendo en ocasiones alimentarse de otros invertebrados, como los colémbolos y ácaros (Schroeter, 2001); entrando de nuevo en la cadena trófica clásica (Bamforth & Lousier, 1995; Wilkinson & Mitchell, 2010). Las especies de menores dimensiones, como las encontradas en cuevas desarrolladas en rocas ígneas, se alimentan de algas unicelulares, bacterias, levaduras, hongos (hifas y esporas) y detritus orgánico (Ogden & Hedley 1980).

Además, las amebas colonizadas por hongos mutualistas son un buen recurso para las plantas en suelos pobres de nutrientes (Vohník *et al.*, 2009). Así como también representan un papel importante en el ciclo del silicio, incrementando la mineralización de la sílice en los suelos (Aoki *et al.*, 2007; Wilkinson & Mitchell, 2010).

Generalmente están presentes en medios subaéreos: aguas continentales libres (ríos, lagos, fuentes), suelos, turberas o biofilms desarrollados sobre cortezas de árboles (Wylezich *et al.*, 2002). En las cuevas desarrolladas en rocas ígneas ácidas, las amebas segregan placas de sílice amorfa (idiosomas) con un patrón específico de distribución espacial, tamaño o geometría de las placas de su testa. Algunas especies incluso desarrollan espinas en sus testas, para asegurar la fijación sobre la superficie de los espeleotemas cuando se desliza sobre ellas la lámina de agua. También se

conocen amebas testáceas con idiosomas de sílice amorfa en cuevas de rocas ígneas básicas (diabasas, peridotitas, etc.), pues pese a tratarse de rocas básicas, existe suficiente Si para su producción, dado que es el elemento más abundante en la superficie de la tierra.

Una testa de ameba tiene forma de botella y unas dimensiones de 100 μm largo y de 50 μm ancho máximo, aunque las estudiadas en nuestro trabajo son de talla menor. En uno de sus extremos se sitúa una abertura (pseudostoma) frecuentemente localizada en la parte más estrecha de la testa con un borde de morfología muy variada, por donde se emiten los pseudópodos, utilizados para capturar alimentos y para la locomoción del protozoo. Este pseudostoma puede estar rodeado de placas modificadas que contienen uno o varios dientes.

Las clasificaciones taxonómicas generales de las amebas testáceas se definen por la morfología de los pseudópodos pero estos no se conservan en los fósiles estudiados en esta tesis. Aun así, las encontradas en esas muestras pueden ser identificadas por las características morfológicas de la testa. Por esto, las observaciones directas al MEB y posterior estudio de las fotos realizadas, nos han permitido junto con la revisión de la bibliografía, identificar las siguientes especies:

- Especies de la familia *Euglyphidae*:
 - *Euglypha rotunda* (Figura 165), largo de 22 a 55 μm . La testa es ovoide con una pequeña compresión lateral cerca del extremo final. Compuesta por aproximadamente 120 plaquetas ovals dispuestas en filas imbricadas. Con plaquetas especializadas que se disponen alrededor del pseudostoma circular y con un diente mediano con 2-3 dientes más pequeños a cada lado.
 - *Euglypha rotunda* var. *minor* (Figura 166), largo de 16 a 25 μm . La testa es ovoide sin compresión lateral y desprovista de espinas. Compuesta por aproximadamente 120 plaquetas ovals dispuestas en filas imbricadas. Con plaquetas especializadas que se disponen alrededor del pseudostoma circular. Estas contienen un diente mediano con 2-3 dientes más pequeños a cada lado.
 - *Euglypha strigosa* (Figura 167), largo de 45 a 100 μm . La testa es ovoide y lateralmente comprimida con un pseudostoma oval localizado en el borde más estrecho. La testa está compuesta por aproximadamente 300 plaquetas ovals dispuestas en filas imbricadas. El pseudostoma está bordeado de unas diez plaquetas y cada una de

estas contiene un diente mediado acompañado a cada lado de 3-4 pequeños dientes. La testa está recubierta de espinas individuales en las uniones de las plaquetas.

- *Euglypha hyalina* (Figura 168), testa de pequeña talla, ovoide, no comprimida lateralmente y desprovista de espinas. Largo de 16 - 36 μm y ancho de 10-20 μm . Las plaquetas orales tienen contorno hexagonal, la mayor anchura es la mitad de la longitud, el extremo frontal carece de engrosamiento y está provisto de 2-3 pares de dientes laterales en la cara interior del borde de la testa.
 - *Sphenoderia lenta* (Figura 169), largo de 30 - 60 μm . La testa es casi esférica compuesta de aproximadamente 60 grandes plaquetas circulares dispuestas en un patrón imbricado.
 - *Tracheleuglypha dentata* (Figura 170), largo de 35 - 65 μm . La testa es ovoide compuesta de alrededor de 100 plaquetas circulares dispuestas en filas imbricadas. El pseudostoma es circular y localizado en la parte más estrecha de la testa y está bordeado por un collar irregular de cemento orgánico.
 - *Tracheleuglypha acolla* (Figura 171), largo de 35 - 65 μm . La testa es ovoide compuesta de alrededor de 100 plaquetas circulares dispuestas en filas imbricadas. El pseudostoma es circular y localizado en la parte más estrecha de la testa y está bordeado por un collar irregular de cemento orgánico.
 - *Assulina muscorum* (Figura 172), largo de 28-58 μm . Testa ancha y ovoide, ligeramente comprimida lateralmente y estrechándose hace el pseudostoma lenticular. La testa está compuesta de alrededor de 300 plaquetas ovales, en ocasiones sueltas o en filas imbricadas.
- Especies de la familia Trinematidae:
- *Trinema complanatum* (Figura 173), largo de 50-60 μm . Testa ovoide, cónica y aplanada en el área subterminal del pseudostoma donde la testa contiene un borde. El pseudostoma es oval e invaginado, y está rodeado de pequeñas plaquetas ovales o circulares que contienen un pequeño y fino diente.
 - *Trinema enchelys* (Figura 174), largo de 35-100 μm . Testa ovoide, típicamente elongada y aplanada en la zona subterminal. Ligeramente invaginada en el área del pseudostoma. Este es circular y bordeado con pequeñas plaquetas ovales, cada una de las cuales contienen un diente fino y pequeño. El cuerpo de la testa está compuesto por plaquetas circulares ligeramente superpuestas y los espacios entre estas están

cubiertos con plaquetas ovales más pequeñas. Existe una pequeña variación entre la testa de *T. enchelys* y *T. lineare* en tamaño.

- *Trinema lineare* (Figura 175), largo de 25-40 µm. Testa pequeña y ovoide, lateralmente cónica hacia el pseudostoma circular subterminal. La testa está compuesta de grandes plaquetas circulares y otras pequeñas que cubren los espacios de las anteriores o solapadas. También contiene plaquetas con dientes pequeños en la periferia del borde del pseudostoma. Es una especie extremadamente común que suele presentarse en grandes grupos.
- *Corythion dubium* (Figura 176), largo de 25-65 µm. Testa ovoide y lateralmente aplanada con un pseudostoma subterminal dentado. Este es semicircular u oval en plano. La testa está formada por pequeñas plaquetas ovales dispuestas solapadas con un patrón de organización a veces aparente. Cada diente del pseudostoma está en una pequeña plaqueta.
- Especies de la familia Nebelida:
 - *Physochila (Nebela) griseola* (Figura 177), largo de 80-90 µm. Testa piriforme terminando en su parte más estrecha en un pseudostoma circular y con collar. La testa está compuesta por pequeñas plaquetas redondeadas y pequeñas piezas de cuarzo, formando crestas y bultos irregulares. El collar está formado por pequeñas plaquetas redondeadas.
- Especies de la familia Centropyxidae:
 - *Centropyxis aerophila* (Figura 178), largo de 53-85 µm. La testa es ovoide y con superficie rugosa, aplanada junto el área del pseudostoma dentado. Este está localizado subterminalmente y es invaginado. Posee un borde grueso y su borde trasero se inclina hacia la zona ventral aplanada.
- Especies de la familia Pseudodiffugiidae:
 - *Pseudodiffugia virescens* (Figura 179), largo de 26-43 µm. Testa piriforme o elíptica, no comprimida, cubierta con partículas diminutas y pseudostoma circular.
- Especies de la familia Plagiopyxidae:
 - *Plagiopyxis declivis* (Figura 180), largo de 60-80 µm. La testa está compuesta de exosomas y es de ovoide a circular en plano y semicircular en vista lateral.
- Especies de la familia Amphitremidae:

- *Amphitrema wrightianum* (Figura 181). La testa es elíptica, comprimida y con una mezcla de partículas silíceas, frústulos de diatomeas o quistes de flagelados cementados. Tiene 2 pseudostomas opuestos y elípticos con o sin un collar pequeño. Pueden medir hasta 150 µm.
- Especies de la familia Phryganellidae:
 - *Phryganella acropodia* (Figura 182), largo de 30-85 µm. Con una testa hemiesférica compuesta por exosomas con un pseudostoma que está centralmente dispuesto entre la región oral aplanada. Este es grande en relación al tamaño de la testa y puede ser rugoso o irregularmente bordeado con granos minerales.
- Especies de la familia Diffugiidae:
 - *Diffugia minutissima* (Figura 183), largo de 7-15 µm. Su pequeña testa es alargada y ovoide. Está compuesta por plaquetas de sílice irregulares, aplanadas y superpuestas. En ocasiones también con frústulos de diatomeas. El pseudostoma tiene forma aproximadamente circular y está localizado en la parte más estrecha de la testa.
 - *Diffugia gramen* (Figura 184), largo de 70-100 µm. Testa casi esférica y compuesta por granos de arena y partículas ligadas con un cemento orgánico. El pseudostoma se localiza terminalmente y es trilobulado y con labio con un pequeño collar de finas partículas.
- Especies de la familia Trigonopyxidae:
 - *Cyclopyxis kahli* (Figura 185), largo de 80-100 µm. El pseudostoma invaginado es pequeño en relación al tamaño de su testa. Esta es circular en plano y hemiesférica en visión lateral.
 - *Cyclopyxis eurystoma* (Figura 186), largo de 50-80 µm. La testa es circular en plano y hemiesférica en visión lateral. Los exosomas que componen la testa son lisos y cubiertos por un cemento orgánico en el borde del ancho e invaginado pseudostoma.
- Especies de la familia Phryganellidae:
 - *Cryptodiffugia oviformis* (Figura 187), largo de 13-25 µm. Pequeña, rugosa y esférica testa con un pequeño pseudostoma circular con collar. La testa está compuesta por material orgánico y fosfato de calcio.

En la tabla 2 podemos observar cómo se distribuyen a lo largo del mundo las especies a lo largo de las muestras analizadas en las cuevas estudiadas y sus características morfológicas.

Las observaciones realizadas para diferentes cuevas de rocas ígneas (Tabla 3), nos han permitido elaborar un inventario de especies bastante variado donde pocas especies son exclusivas de una única localidad. Siendo la especie *Corythion dubium*, la más abundante con diferencia, seguida de las especies *Euglypha rotunda*, *Trinema complanatum* y *Trinema lineare* (Gráfico 1).

Aunque el trabajo se realizó sobre una muestra geográficamente muy diversa (aunque con claro predominio de las muestras de España y Suecia) (Gráfico 2) señala una gran homogeneidad en la distribución de las amebas (Gráficos 3-19). Esto indica que, a pesar de las diferentes condiciones bioclimáticas que se dan en el entorno exterior de la cueva, dentro de las mismas existe un ambiente estable que explica esta similitud de las especies identificadas. Aparentemente, los microecosistemas donde se localizan las amebas en las cuevas graníticas son similares en todos los casos estudiados, independientemente de las características climáticas que existan en el exterior de la cavidad. Es evidente que se precisaría estudiar una muestra mayor, tanto en el número de espeleotemas estudiados como de las zonas de procedencia.

Se observa, también, que en algunas localidades aparecen más o menos amebas desintegradas. Por ejemplo, en localidades como Tcharkulda Rock, Murhys Hystack y Gundaring, en Australia, las amebas que se observan aparecen intactas, no encontrando ninguna desintegrada. Sin embargo, en localidades como Trollhallet, Castelo da Furna y Porteliña se encuentran multitud de testas desintegradas, sobre todo del género *Trinema*. Es posible que la presencia de testas desintegradas, se deba a su transporte en el seno de la lámina de agua que envuelve a los depósitos. Donde aparecen mayor número de estas, es en regiones con mayor aporte de agua a la cueva (España, Suecia). Sin embargo, en regiones más áridas (Australia) donde el agua no ejerce como agente de erosión con tanta frecuencia, las testas de las amebas no sufren transporte y las condiciones del medio (mayor temperatura), favorecen para que se incorporen al sustrato y se reciclen con mayor rapidez (Aoki *et al.*, 2007).



Gráfico 1. Abundancia de las diferentes especies de amebas en los espeleotemas estudiados.

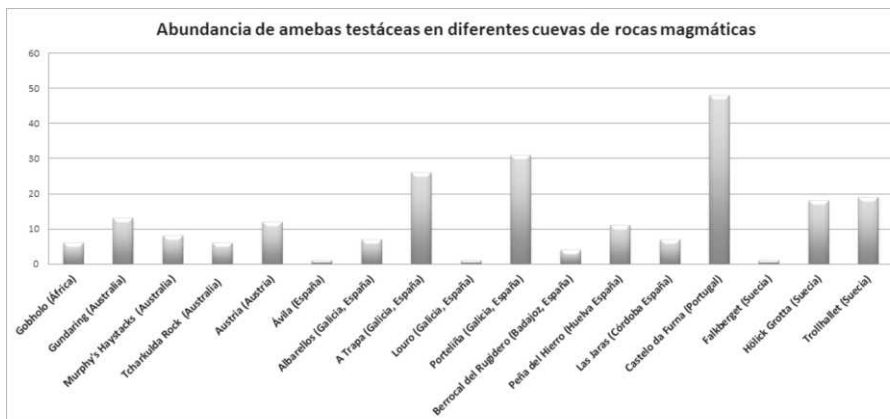


Gráfico 2. Abundancia de amebas testáceas en diferentes cuevas de rocas magmáticas por región.

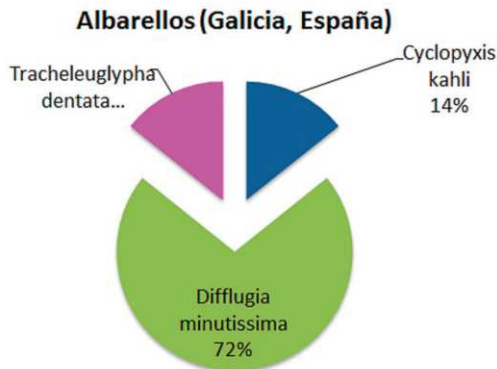


Gráfico 3

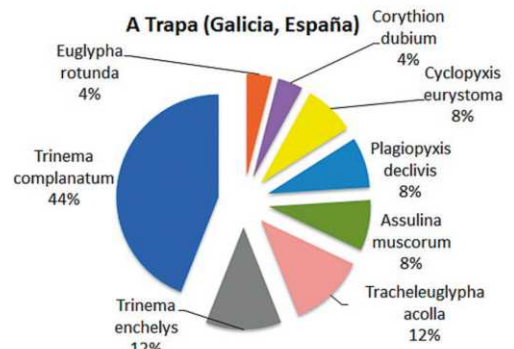


Gráfico 4

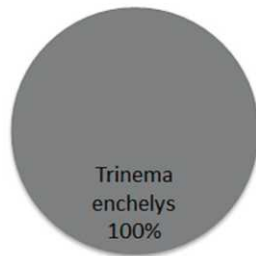
Louro (Galicia, España)

Gráfico 5

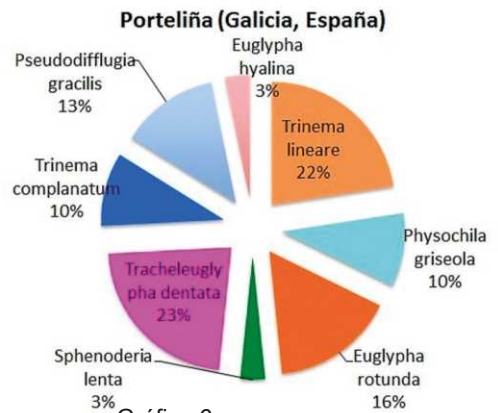


Gráfico 6

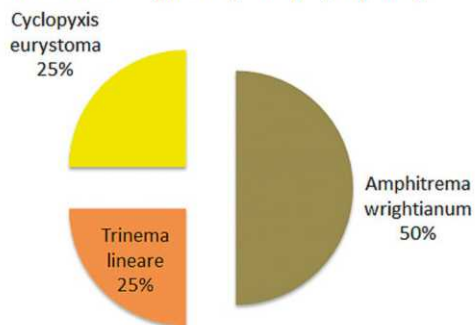
Berrocal del Rugidero (Badajoz, España)

Gráfico 7

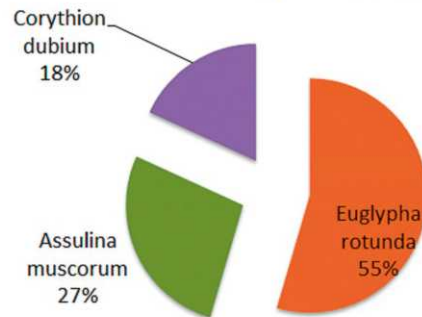
Peña del Hierro (Huelva, España)

Gráfico 8

Gráficos 3-8. Diagramas de sectores mostrando la abundancia, en porcentaje, de las distintas especies de amebas testáceas en las diferentes localidades estudiadas.

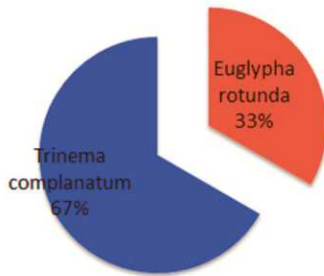
Gobholo (África)

Gráfico 9

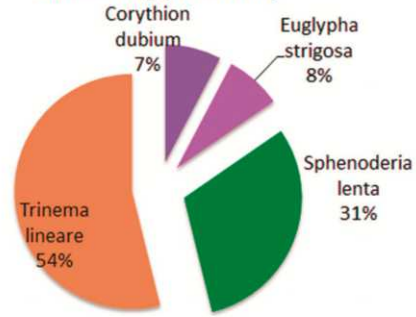
Gundaring (Australia)

Gráfico 10

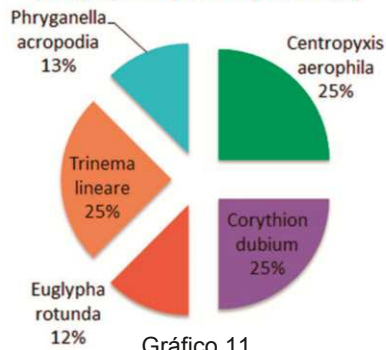
Murphy's Haystacks (Australia)

Gráfico 11

Tcharkulda Rock (Australia)

Gráfico 12

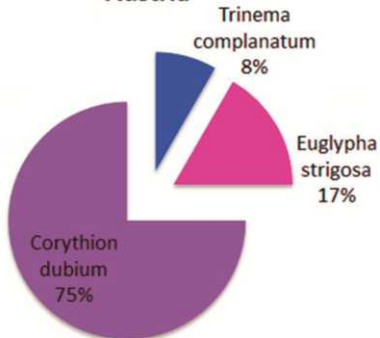
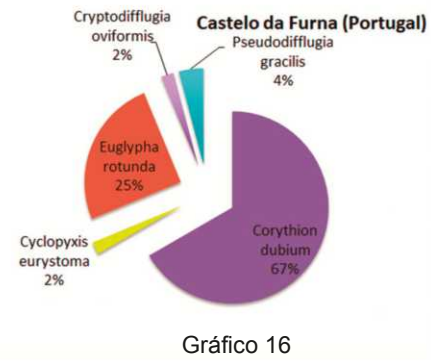
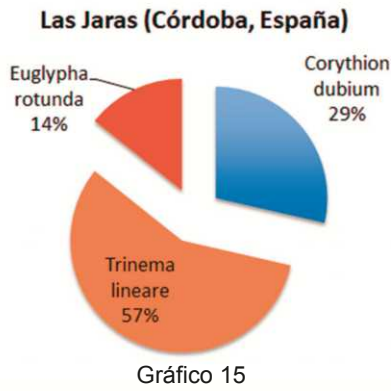
Austria

Gráfico 13

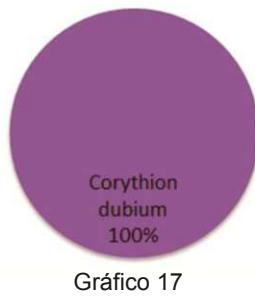
Ávila (España)

Gráfico 14

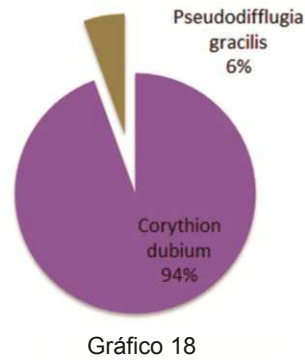
Gráfico 9-14. Diagramas de sectores mostrando la abundancia, en porcentaje, de las distintas especies de amebas testáceas en las diferentes localidades estudiadas.



Falkberguet (Suecia)



Hölick Grotta (Suecia)



Trollhallet (Suecia)

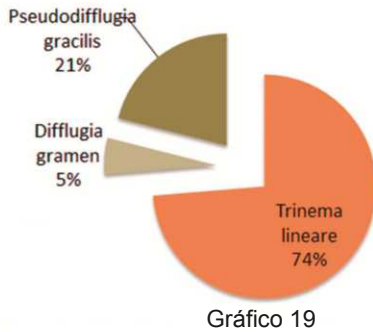


Gráfico 15-19. Diagramas de sectores mostrando la abundancia, en porcentaje, de las distintas especies de amebas testáceas en las diferentes localidades estudiadas.

List of Testate amoebae, sampling location and morphometric measurements											
Taxon name	Cave	Sampling location	Shell shape	Average of Shell dimensions (µm)		Pseudostome			Shell composition	Shell building units	n (number of shells measured)
				Length	Breadth	Dimensions	Shape	Position			
<i>Amphitrema wrightianum</i>	Berocal del Rugidero	Badajoz, España	globular	116,57 ± 0,69	120,74 ± 22,18				agglutinated: collombolan body parts, mineral grains	exosomes	2
<i>Assulina muscorum</i>	Peña del Hierro	Huelva, España	ovoid, compressed	35,89 ± 4,69	29,11 ± 14,06	11,47	narrow oval	terminal	elliptical silicious plates	idiosomes	2
<i>Assulina muscorum</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid, compressed	38,97	29,22		narrow oval	terminal	elliptical silicious plates	idiosomes	1
<i>Centropyxis aerophila</i>	Murphy's Haystacks	Australia	ovoid	42,87 ± 2,06	32,02 ± 0,81	15,02	oval, invaginated	subterminal	agglutinated mineral grains	exosomes	2
<i>Corythion dubium</i>	Gundaring	Australia	ovoid, laterally flattened	17,98	15,04	3,42	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Corythion dubium</i>	Murphy's Haystacks	Australia	ovoid, laterally flattened	24,54 ± 9,66	15,42 ± 6,94	6,18 ± 0,51	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	2
<i>Corythion dubium</i>	Austria	Austria	ovoid, laterally flattened	25,01 ± 4,31	16,88 ± 6,97	6,20 ± 2,60	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	7
<i>Corythion dubium</i>	Castelo da Furna	Portugal	ovoid, laterally flattened	32,82 ± 4,84	21,60 ± 4,17	7,77	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	22
<i>Corythion dubium</i>	Falkberget	Suecia	ovoid, laterally flattened	39,15	27,77		toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Corythion dubium</i>	Hölick Grotta	Suecia	ovoid, laterally flattened	32,76 ± 1,46	23,30 ± 4,14	8,29 ± 1,69	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	10
<i>Corythion dubium</i>	Las Jaras	Córdoba, España	ovoid, laterally flattened	22,4 ± 0,42	11,33 ± 1,37		toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	2
<i>Corythion dubium</i>	Peña del Hierro	Huelva, España	ovoid, laterally flattened	33,97	16,02	4,5	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Corythion dubium</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid, laterally flattened	33,84	27,39	9,94	toothed	subterminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Cryptodiffugia oviformis</i>	Castelo da Furna	Portugal	ovoid	26,74	23,14	8,61	with a thick collar	terminal	smooth surface	exosomes	1
<i>Cyclopaxys eurystoma</i>	A Trapa	Galicia, España	spherical	25,73 ± 6,82		9,51 ± 6,14	subcircular, invaginated	terminal	agglutinated mineral grains	exosomes	2
<i>Cyclopaxys eurystoma</i>	Berocal del Rugidero	Badajoz, España	spherical	41,08	40,98	18,72	subcircular, invaginated	terminal	agglutinated mineral grains	exosomes	1
<i>Cyclopaxys eurystoma</i>	Castelo da Furna	Portugal	spherical	28,57	31,65	14,3	subcircular, invaginated	terminal	agglutinated mineral grains	exosomes	1
<i>Cyclopaxys kahli</i>	Albarcellos	Galicia, España	hemispherical	53,2	105,34	33,29	subcircular, invaginated	terminal	agglutinated mineral grains	exosomes	1
<i>Diffugia gramen</i>	Trollhallet	Suecia	ovoid	35,2	41,88	16,22	lipped	terminal	mineral grains	exosomes	1
<i>Diffugia minutissima</i>	Albarcellos	Galicia, España	spherical		18,92 ± 1,08	6,82 ± 0,35	circular	terminal	mineral grain, circular plates, diatom frustules	exosomes	5
<i>Euglypha hyalina</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	13,14	13,37	6,97	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Euglypha rotunda</i>	Castelo da Furna	Portugal	ovoid, compressed	39,66 ± 3,08	22,55 ± 2,32	10,73 ± 1,43	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	8
<i>Euglypha rotunda</i>	Gobholo	África	ovoid, compressed	41,99 ± 10,39	22,92 ± 5,52	6,5	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	2
<i>Euglypha rotunda</i>	Las Jaras	Córdoba, España	ovoid, compressed	41,53	12,79	5,89	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Euglypha rotunda</i>	Murphy's Haystacks	Australia	ovoid, compressed	31,45	15,21	6,69	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Euglypha rotunda</i>	Peña del Hierro	Huelva, España	ovoid	34,97 ± 3,32	20,36 ± 3,28	10,31 ± 1,50	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	4
<i>Euglypha rotunda var. minor</i>	Peña del Hierro	Huelva, España	ovoid	32,33	26,25	9,91	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Euglypha rotunda</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	18,74 ± 4,12	11,73 ± 1,77	5,57 ± 0,73	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	5
<i>Euglypha rotunda</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid, compressed		41,74	23,36	circular, toothed	terminal	oval plates	idiosomes	1
<i>Euglypha strigosa</i>	Austria	Austria	ovoid, compressed	47,28 ± 19,98	33,14 ± 8,48	15,37 ± 1,46	circular, toothed	terminal	oval plates and spines	idiosomes	2
<i>Euglypha strigosa</i>	Gundaring	Australia	ovoid, compressed	50,2	24,58	14,21	circular, toothed	terminal	oval plates and spines	idiosomes	1
<i>Phryganella acropodia</i>	Murphy's Haystacks	Australia	hemispherical	24,44		13,18	circular	terminal	agglutinated mineral grains	exosomes	1
<i>Physoclitia griscolia</i>	Porteliña	Galicia, España	pyriform	83,58 ± 13,66	50,10 ± 10,26	24,85 ± 1,66	circular	terminal	silicious scales and quartz grains	idiosomes	3
<i>Platycopaxys declivis</i>	A Trapa	Galicia, España	hemispherical	48,14 ± 3,48	52,17 ± 3,30	24,79 ± 0,67	curved	subterminal	agglutinated mineral grains	exosomes	2
<i>Pseudodiffugia gracilis</i>	Castelo da Furna	Portugal	ovoid	31,41 ± 5,53	19,32 ± 4,43				agglutinated mineral grains	exosomes	2
<i>Pseudodiffugia gracilis</i>	Hölick Grotta	Suecia	ovoid	14,81	11,02				agglutinated mineral grains	exosomes	1
<i>Pseudodiffugia gracilis</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	33,56 ± 10,92	19,28 ± 6,85				agglutinated mineral grains	exosomes	4
<i>Pseudodiffugia gracilis</i>	Trollhallet	Suecia	ovoid	19,10 ± 4,74	13,60 ± 4,44				agglutinated mineral grains	exosomes	4
<i>Sphenoderia lenta</i>	Gundaring	Australia	spherical	18,88 ± 1,66	10,90 ± 1,69		elongated	terminal	circular plates	idiosomes	2
<i>Sphenoderia lenta</i>	Porteliña	Galicia, España	spherical	24,26	17,09		elongated	terminal	circular plates	idiosomes	2
<i>Tracheleuglypha acolia</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid	25,10 ± 2,94	25,42 ± 1,40	11,66 ± 1,21	circular	terminal	circular plates and mineral grains	idiosomes and exosomes	3
<i>Tracheleuglypha dentata</i>	Albarcellos	Galicia, España	ovoid	43,52	23,25		circular	terminal	imbricated rows of circular plates	idiosomes	1
<i>Tracheleuglypha dentata</i>	Ávila	España	ovoid	35,04	28,18	12	circular	terminal	imbricated rows of circular plates	idiosomes	1
<i>Tracheleuglypha dentata</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	38,93 ± 6,92	22,69 ± 0,92	7,63	circular	terminal	imbricated rows of circular plates	idiosomes	7
<i>Trinema complanatum</i>	Austria	Austria	ovoid	38,37	23,4	8,53	oval with a strong rim	subterminal	circular plates	idiosomes	1
<i>Trinema complanatum</i>	Gobholo	África	ovoid	41,97 ± 1,26	25,54 ± 1,49	12,56	oval with a strong rim	subterminal	circular plates	idiosomes	3
<i>Trinema complanatum</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	24,76 ± 0,70	13,66 ± 1,15	5,13 ± 1,01	oval with a strong rim	subterminal	circular plates	idiosomes	3
<i>Trinema complanatum</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid	54,63 ± 7,30	33,12 ± 4,82	15,26 ± 2,14	oval with a strong rim	subterminal	circular plates	idiosomes	11
<i>Trinema lineare</i>	Tcharkulda Rock	Australia	ovoid	29,46 ± 3,65	18,67 ± 5,23	6,60 ± 2,62	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	6
<i>Trinema lineare</i>	Murphy's Haystacks	Australia	ovoid	20,25 ± 1,31	13,29 ± 2,11	6,05 ± 0,76	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	2
<i>Trinema lineare</i>	Gundaring	Australia	ovoid	25,74 ± 4,80	13,38 ± 1,67	4,95 ± 0,03	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	7
<i>Trinema lineare</i>	Trollhallet	Suecia	ovoid	29,09 ± 3,77	13,20 ± 1,87	5,82 ± 0,50	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	13
<i>Trinema lineare</i>	Porteliña	Galicia, España	ovoid	25,52 ± 10,37	14,82 ± 8,64	8,53 ± 6,03	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	3
<i>Trinema lineare</i>	Berocal del Rugidero	Badajoz, España	ovoid	22,35	17,37		circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	1
<i>Trinema lineare</i>	Las Jaras	Córdoba, España	ovoid	29,39 ± 1,18	13,05 ± 0,94	5,86 ± 0,24	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	4
<i>Trinema enchylys</i>	A Trapa	Galicia, España	ovoid	43,47 ± 1,06	32,37 ± 7,69	13,95 ± 0,70	circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	2
<i>Trinema enchylys</i>	Louro	Galicia, España	ovoid	47,28	32,24		circular	subterminal	two size circular plates	idiosomes	1

Tabla 2. Distribución y morfología de las amebas testáceas analizadas en los bioespeleotemas de cuevas desarrolladas en rocas graníticas en todo el Mundo.

	AFRICA		AUSTRALIA		AUSTRIA	ESPAÑA				PORTUGAL		SUECIA				
	Gobolo	Gundaring	Murphy's Haystacks	Tcharkulda Rock	Austria	Ávila	Badajoz, Berrocal del Rujidero	Huelva, Peña del Hierro	Córdoba, Las Jaras	Galicia, Louro	Galicia, Albarelos	Galicia, Portefría	Galicia, A Trapa	Falkberget	Holick Grotta	Trollhalet
<i>Amphitema wrightianum</i> (Archer, 1869)							2									
<i>Assulina muscorum</i> (Greef, 1888)								3					2			
<i>Ceratomyx aerophila</i> (Deflandre, 1929)			2													
<i>Corythion dubium</i> (Taraneh, 1871)		1	2		9				2			2		32	1	17
<i>Cryptodiffugia oviformis</i> (Penard, 1902)														1		
<i>Cyclopyxis eurystoma</i> (Deflandre, 1929)							1					2		1		
<i>Cyclopyxis kahli</i> (Deflandre, 1929)										1						
<i>Diffugia gramen</i> (Penard, 1902)																1
<i>Diffugia minutissima</i> (Penard, 1904)											5					
<i>Euglyphis hyalina</i> Cousteaux, 1978												1				
<i>Euglyphis rotunda</i> (Ehrenberg, 1845)	2		1					5	1		5	1		12		
<i>Euglyphis strigosa</i> (Ehrenberg, 1848)		1			2											
<i>Phryganella acropodia</i> (Hertwig & Lesser, 1874)			1													
<i>Physochila griseola</i> (Penard, 1911)												3				
<i>Plagiopyxis declivis</i> (Bonnet & Thomas, 1938)													2			
<i>Pseudodiffugia gracilis</i> (Schlumberger, 1845)														2		
<i>Splendideria lenta</i> (Schlumberger, 1845)		4										4				
<i>Tracheleuglyphis acida</i> (Bonnet & Thomas, 1953)												1				
<i>Tracheleuglyphis dentata</i> (Deflandre, 1928)						1				1	7		3			
<i>Trinema complanatum</i> (Penard, 1890)	4				1											
<i>Trinema enchelys</i> (Ehrenberg, 1838)										1						
<i>Trinema lineare</i> (Penard, 1890)		7	2	6			1		4			7				14

Tabla 3. Distribución biogeográfica y abundancia de las amebas testáceas en bioespeleotemas desarrollados en cuevas de rocas graníticas.

4.1.4.4. Algas diatomeas

Las diatomeas son un grupo de algas microscópicas unicelulares y eucariotas cuyo frústulo, donde se protege la célula, se compone de silicio (60 % de SiO_2), lo que le confiere dureza y resistencia (Blanco *et al.*, 2010). Están compuestas de dos valvas (tecas) que encajan entre sí solapándose. La superior (epiteca) es mayor y envuelve a la inferior (hipoteca) (Figura 188). En la valva se desarrollan toda una serie de ornamentaciones que permiten su identificación taxonómica. Longitudinalmente, en muchas especies la valva está atravesada por un delgado surco llamado rafe, que atraviesa la teca hasta el protoplasto (donde se encierra la membrana plasmática). La locomoción de las células es posible gracias a la hendidura del rafe, ya que bajo ella se halla un orgánulo que puede contraerse y expandirse rítmicamente. Perpendiculares al rafe, se encuentran varias series de líneas de perforaciones llamadas areolas, la sucesión de éstas en cada línea forma una estría. Uniendo las dos teclas se encuentra la cintura, que está formada por una cantidad variable de cópulas o anillos que envuelven la célula y que poseen el mismo contorno que ésta (Álvarez Blanco, 2008). Las diatomeas se reproducen principalmente por bipartición.

Los diferentes géneros que componen la gran biodiversidad de diatomeas encontradas en estos ambientes, identificados a través de su análisis con MEB, son los siguientes (Tabla 4):

- *Achnanthes* sp. (Figuras 189-191).
- *Aulacoseira* sp. (Figuras 192-193).
- *Eunotia* sp. (Figuras 194-195).
- *Fragilaria* sp. (Figuras 196-197).
- *Hantzchia* sp. (Figura 198).
- *Lemnicola* sp. (Figura 199).
- *Luticola* sp. (Figura 200).
- *Melosira* sp. (Figuras 201-202).
- *Muelleria* sp. (Figura 203).
- *Orthoseira* sp. individuales y formando colonias (Figuras 204-206).
- *Punctastriata* sp. (Figura 207).
- *Spicaticribra* sp. (Figura 208).
- *Stephanodiscus* sp. (Figura 209).

Las regiones en las que mayor abundancia de especies se han encontrado han sido España y Argentina (Gráfico 20). Pudiendo ser esto un efecto de que en España existen mayor número de cuevas estudiadas y que en Argentina existía una cueva donde se encontró un crecimiento masivo de diatomeas en la muestra estudiada.

La especie que se encuentra en mayor abundancia y más ampliamente distribuida en las cuevas magmáticas del Mundo es *Orthoseira* sp. (Gráfico 21), la cual aparece en un total de 8 cuevas en una abundancia de hasta 70 ejemplares, formando biofilms visibles a simple vista (Albarells, Galicia). El género *Aulacoseira* sp. también es muy recurrente y ha sido encontrado en una gran abundancia (hasta 30 ejemplares) en Pampa de Achala (Argentina) (Tabla 4). *Melosira* sp. y *Muelleria* sp. también se encuentran en gran abundancia en las cuevas estudiadas. Las restantes destacan por estar presentes en menor abundancia y otras (casi un 15 % de la abundancia) no se han podido identificar (Figuras 210-214). Las restantes destacan por estar presentes en menor abundancia y otras (casi un 15 % de la abundancia) también presentes no se han podido identificar.

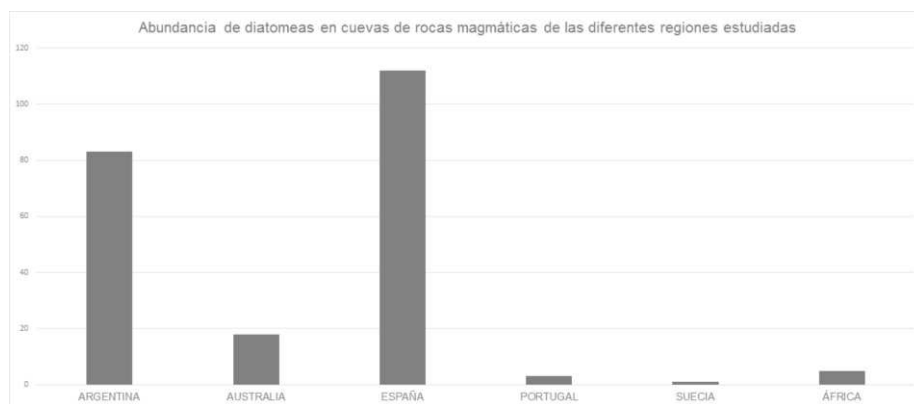


Gráfico 20. Abundancia de diatomeas en cuevas de rocas magmáticas en las diferentes regiones estudiadas.

ABUNDANCIA DE LAS DIATOMEAS EN CUEVAS DE ROCAS MAGMATICAS

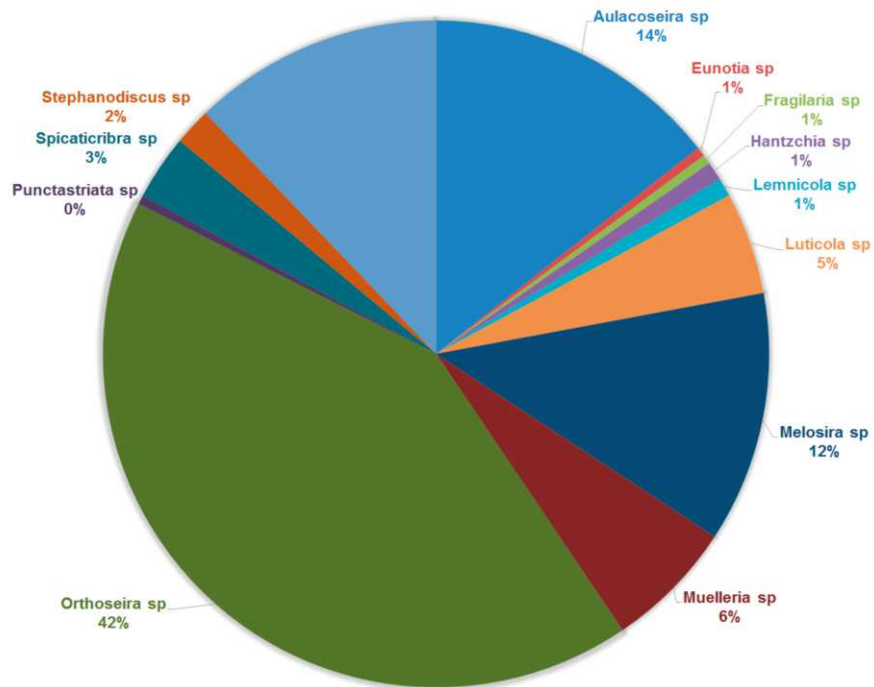


Gráfico 21. Abundancia de los géneros de diatomeas encontradas en las cuevas de rocas magmáticas estudiadas.

Region	Cave	Aulacoseira	Eurolla	Fragilaria	Hantzschia	Lemnicola	Luticola	Melosira	Muelleria	Orthoseira	Punctastralia	Spicatulirba	Stephanodiscus	Otros
AFRICA	Gobholo	1			1				3		4			
ARGENTINA	Cerro Blanco							17						1
	Colegio Liqueño													
	El Zapato													2
	Los Riosanos								4	5				
	Pampa Blanca			1					2	1			2	
	Pampa de Achala	30					3	8						
	Señor de La Peña					2								
ESPAÑA	Vereda de San Martín													
	Albarellos									70				12
	Ávila								2					
	Berrocal del Rujidero								1					
	Campofrío													
	Las Jaras						3							
	Los Barruecos								1					
	Los Marinos									1				
	Monte Louro													1
	Peña del Hierro						1							
	Porteña							2			2	7		7
	Trapa													2
PORTUGAL	Castelo da Furna	1									1			1
SOUTH AUSTRALIA	Murphys Haystack													
	Tcharkulda									6				
SUECIA	Pukeberg	1												
	Toro													
WESTERN AUSTRALIA	Gundarrn Hill						4							
	Hyden Rock								1				2	1

Tabla 4. Abundancia y distribución de las especies de diatomeas presentes en las diferentes localidades de cuevas estudiadas.

4.1.4.5. Artrópodos (Filo *Arthropoda*)

El filo *Arthropoda* (gr. *Arthros*= articulación, *pous*=pie) lo forma un amplio grupo de animales que han alcanzado gran diversidad de formas y un gran éxito evolutivo, siendo el filo animal más abundante. Su origen es muy antiguo, se piensa que se remontan al Precámbrico, hace 3100-580 millones de años. Desde el punto de vista ecológico, es uno de los grupos de seres vivos más interesantes. Esto es debido a que, por el número de especies y de individuos que lo forman, dominan tanto los ecosistemas acuáticos como terrestres; y porque la mayor parte de la energía que circula en los ecosistemas pasa por ellos, al encontrarse en varios niveles de las cadenas alimentarias. Poseen una gran plasticidad adaptativa, lo que les ha permitido la colonización de un gran número de hábitats. Su característica distintiva es la presencia de un exoesqueleto (cutícula) endurecido, quitinoso, secretado por las células epiteliales de la epidermis. A pesar de las ventajas que presenta el exoesqueleto, plantea inconvenientes para el crecimiento, aunque la solución a este problema reside en la posibilidad de desprenderse periódicamente del mismo, en el proceso de muda o ecdisis. Estas mudas (o exuvias), en muchos casos, son las que se conservan sobre los espeleotemas y las que nos permiten identificar indirectamente, la presencia de estos organismos. Son animales segmentados con simetría bilateral y con apéndices que evolucionaron para desarrollar diversas funciones o que desaparecieron. Otros de los restos habituales de artrópodos que ponen en evidencia su presencia sobre los espeleotemas, son estos apéndices o las escamas que recubren su cutícula externa.

El filo Artropoda se subdivide en diferentes subfilos y en este trabajo se han encontrado miembros de diferentes subfilos: hexápodos, crustáceos y quelicerados.

4.1.4.5.1. Hexápodos (Subfilo *Hexapoda*)

4.1.4.5.1.1. Colémbolos (Orden *Collembola*)

Los colémbolos son artrópodos diminutos que poseen unas características propias entre las que destaca su condición áptera (sin alas) y otros caracteres (Cassagnau, 1971) que permiten que sean identificados como artrópodos primitivos. Además, tienen dos características únicas que los definen como grupo: un órgano saltador o furca, situado ventralmente en el cuarto segmento abdominal, y un tubo ventral en el primer segmento abdominal, relacionado con la regulación hídrica y que además puede tener funciones de órgano adhesivo (Figura 215).

Existen dos tipos fundamentales de colémbolos (Jordana & Arbea, 1989), uno de ellos presenta una morfología alargada y segmentación del cuerpo regular (órdenes *Entomobryomorpha* y *Poduromorpha*, por lo general, son los colémbolos más representativos de cuevas) y otro tipo más globular (órdenes *Neelileona* y *Symphypleona*) (Figura 216). El cuerpo está dividido en tres tagmas, tienen antenas y apéndices torácicos para la locomoción, los cuales presentan un tibiotarso donde se sitúa una uña simple. El abdomen está formado por seis segmentos generalmente. En el segmento abdominal IV se encuentra la furca, compuesta por un manubrio, dientes, y al final, el mucrón (Figura 217). Respecto al tegumento la cutícula es lisa o granulosa (*Poduromorpha* (Figuras 218-219) y *Neanuridae*). Otra formación cuticular son las sedas (Figura 220), las cuales se insertan en un adelgazamiento de la cutícula para permitir su movilidad y la recepción mecanosensorial. Tienen diferentes tamaños y morfologías, desde lisas a espiciformes o ciliadas (Figuras 221-227) y se han encontrado sobre la superficie de los espeleotemas en abundancia, debido a que estos organismos utilizan el depósito como medio físico sobre el que vivir y desplazarse, perdiendo fragmentos de su cutícula externa a su paso. En las muestras de espeleotemas se han encontrado restos de exuvias que han permitido identificar todos estos rasgos; habiendo, sobre todo, fragmentos de cutícula con granulación repartida uniformemente en dibujos octogonales (Figuras 228-229) y con sedas o quetas que recubren la misma (Figuras 230-231). Por otro lado, también se han encontrado escamas de su cutícula, las cuales son sedas transformadas en forma de láminas ciliadas que producen irisaciones plateadas o metálicas en superficie (Figuras 232-236) y que son características de especies de la familia *Entomobryidae* (Soto-Adames *et al.*, 2008; Massoud & Ellis, 1977; Stebaeva, 1988). Otros de los rasgos identificados en sus restos, que nos han permitido conocer la presencia de estos organismos sobre los espeleotemas, son las uñas. Éstas contienen dos bordes laterales y uno interno (Figuras 237-239). Los laterales pueden presentar dientes basales o apicales, mientras que el interno puede tenerlos basales o apicales o ambos a la vez en número variable. Además, estos organismos presentan caracteres troglomorfos, que son adaptaciones al ambiente subterráneo en el que se han desarrollado, como ausencia de ojos y de pigmento y antenas largas.

Las exuvias encontradas confirman que se trata de ejemplares pertenecientes, sobre todo, a la familia *Entomobryidae*. Estos presentan una uña con cuatro dientes internos y, según la literatura, podrían pertenecer al género *Heteromurus*. Pudiendo tratarse probablemente de *H. nitidus*, ya que es la especie más abundante en cuevas. Esta especie es de amplia repartición, hemiedáfica y troglófila ambimorfa, ya señalada en

cuevas de Andalucía anteriormente. Es una especie guanobia típica, muy abundante en casi todas las cuevas habitables del centro, levante y sur de España. Aunque rara, se ha encontrado también como epigea, apareciendo siempre en lugares umbríos.

Por otro lado, la especie *Entomobrya nivalis* también se ha encontrado en las muestras estudiadas. Esta es muy habitual en cuevas y ya ha sido citada en rocas magmáticas por López Galindo (2013). Mediante su estudio bajo SEM (Figura 230), se ha podido observar su antena (probablemente el artejo IV) cuyas sésilas lisas y ciliadas indican que el ejemplar pertenece a la especie citada.

Otros miembros de la familia *Entomobryidae* (*Lepidocyrtus* sp.) podrían estar presentes debido a las diferentes escamas que se han encontrado sobre las muestras estudiadas. Las escamas y la estructura octagonal de la cutícula también podrían pertenecer al género *Tomocerus* sp. (Ghiradella, 2010). Según este autor, la estructura de las macroquetas (escamas y cerdas) (Figuras 235, 220) que recubren su cutícula externa, están ingeniadas para el desplazamiento libre, en entornos donde el agua cambia su tensión superficial debido a la presencia de surfactantes en el medio.

En general, se han encontrado mudas de colémbolos (Figuras 240-246) en mayor abundancia en regiones como Peña del Hierro (Huelva, España). Sin embargo, los colémbolos están presentes en todo el mundo y hay un gran número de géneros cosmopolitas. Es por esto que también se presentan en las cuevas estudiadas en las regiones de todo el Mundo: A Cunchosa, Albarellos (Galicia, España); Berrocal del Rugidero, Los Barruecos (Extremadura, España); Peña del Hierro (Huelva, España); Castelo da Furna (Portugal); Gobholo (África); Gundaring, Hyden Rock, Murphy's Haystacks (Australia).

4.1.4.5.1.2. Tisanuros (Orden *Thysanura* - *Zygentoma*)

Los tisanuros, conocidos con el nombre de "pececitos de plata" (Figuras 247-248), son otro de los grupos presentes sobre los depósitos estudiados. Su tamaño varía entre 2-20 mm y generalmente están cubiertos de escamas que les confieren brillo metálico. Son insectos apterigotas (sin alas) que generalmente se encuentran entre grietas pedregosas, en la corteza de los árboles o bajo el mantillo de los bosques. Los tisanuros se alimentan de hongos o materia orgánica en descomposición y es por esto por lo que pueden vivir sobre los espeleotemas. Una de las especies encontradas en las cuevas estudiadas podría ser *Pedetontus nipponicus*, así como *Lepisma saccharina*, especie cosmopolita, frecuente en casas y bibliotecas.

La presencia de estos organismos en las cuevas se ha detectado gracias a la presencia de macroquetas (escamas) sobre las muestras e *in situ*, en las campañas de recogida de muestras, donde aparecían desplazándose sobre la superficie de los depósitos (Figura 249). Sin embargo, determinar la fauna de la cueva mediante recogida activa de material biológico no forma parte de los objetivos de este trabajo; por ello, solo han sido fotografiados para mencionar su presencia y relación con el medio estudiado.

4.1.4.5.1.3. Lepidópteros (Orden *Lepidoptera*)

Los lepidópteros, comúnmente conocidos como “mariposas”, son un grupo de insectos caracterizados por tener dos pares de alas membranosas que, al igual que el cuerpo, están cubiertas por finas escamas. Las piezas bucales están formadas por las maxilas, y normalmente forman un tubo largo: la espiritrompa, que se enrolla bajo la cabeza en reposo. Es característico su ciclo vital en el que sufre una metamorfosis completa: se inicia con el huevo, del que surge una larva de colores diversos, que crece y da lugar a la pupa o crisálida; se produce la metamorfosis y de esa crisálida, con el tiempo acaba saliendo una mariposa adulta o imago. Este adulto, volador, asume el papel de dispersor, además del de reproductor. Además, este adulto en su visita a las cuevas, deja restos como las escamas encontradas sobre la superficie de los espeleotemas. Estas tienen diferentes morfologías y pertenecen a lepidópteros nocturnos. Las escamas han sido identificadas mediante los exámenes de las muestras al MEB (Figuras 250-252).

4.1.4.5.2. Crustáceos (Subfilo *Crustacea*)

4.1.4.5.2.1. Isópodos (Orden *Isopoda*)

Estos pertenecen, junto con los artrópodos colémbolos y thysanuros, al grupo llamado “fósiles vivientes”. Los isópodos terrestres son crustáceos eumalacostráceos, casi todas las especies descritas son marinas, excepto algunas terrestres como las conocidas “cochinillas de humedad” o “bichos bola” pertenecientes al género *Armadillium* y entre las que destacan las cavernícolas. Son de pequeño tamaño, rara vez sobrepasan el centímetro y medio y son de colores pardos o grisáceos, adaptándose a la coloración del fondo, para pasar desapercibidos. Los isópodos terrestres son saprófagos, especialmente consumidores de humus, aunque se han observado comportamientos de forrajeo de carroña.

Su presencia se ha visto *in situ* en las campañas de recogida de muestras donde aparecían desplazándose sobre la superficie de los depósitos (Figura 253). Sin embargo, determinar la fauna de la cueva mediante recogida activa de material biológico, no forma parte de los objetivos de este trabajo, por ello solo han sido fotografiados para mencionar su presencia y relación con el medio estudiado.

4.1.4.5.3. Quelicerados (Subfilo *Chelicerata*)

4.1.4.5.3.1. Arácnidos (Orden *Araneae*)

Son arañas tejedoras. Poseen un escudo ovalado en el prosoma, el área ocular está constituida por sus 8 ojos dispuestos en dos filas. Cuentan con apéndices prosómicos que se pueden dividir en 3 grupos: los quelíceros, son robustos, verticales y paralelos cuyos márgenes son oblicuos, cortos y están provistos de una serie de dientes; los pedipalpos y los 4 pares de apéndices marchadores o patas, que se sitúan en la región torácica cubiertas de macrosetas (Figuras 254-257). Tanto las arañas sedentarias constructoras de telas como las errantes, son formas exclusivamente carnívoras. Sus presas generalmente son insectos y, en ocasiones otras arañas. Las arañas, junto con los ácaros, constituyen uno de los más importantes y diversos grupos de arácnidos. Las arañas cavernícolas poseen todas las formas intermedias entre la vida epígea y la hipógea. La gran mayoría de las arañas que encontramos en las cuevas, son formas lucífugas e higrófilas; que no suelen pasar de la zona de entrada, probablemente debido a que su alimento habitual (los insectos) sólo es abundante en esta zona. La mayoría de las formas cavernícolas, derivan de grupos de especies que habitan en los bosques, en biotopos húmedos, con musgos, o entre la hojarasca.

4.1.4.5.3.2. Ácaros (Orden *Acarina*)

Los ácaros son arácnidos con abdomen no segmentado y unido directamente al cefalotórax (Figura 258); sus piezas bucales están transformadas para picar, morder o succionar. Constituyen un grupo muy heterogéneo de arácnidos, con muchísimas especies. La mayoría de ellas de tamaños diminutos y parásitos de animales o plantas. Los ácaros se agrupan en dos superórdenes: *Anactinotrichida* y *Actinotrichida*, dentro de este se encuentra el orden *Oribatei*, que es el que abunda en las cuevas estudiadas.

La alimentación de los ácaros varía mucho entre las numerosas especies; por eso los quelíceros se han ido modificando, adaptándose incluso para excavar. En las

muestras estudiadas se han encontrado ácaros excavadores, que dejan sus puestas enterradas en el depósito, formando nidos o madrigueras (López Galindo, 2013).

Se han encontrado diferentes especies de ácaros que no han sido identificadas por carecer de ejemplares para su estudio taxonómico. Estos artrópodos aparecen en muestras detríticas sobre el sustrato; presentando, en unas ocasiones, coloración rojiza y cuerpo redondeado (Figuras 259-261) y en otras, una cutícula externa con la misma textura que el depósito, por lo que se camuflan extraordinariamente (Figura 262). Estos viven sobre el espeleotema, utilizándolo como mero soporte físico sobre el que desplazarse o para formar sus madrigueras (Figura 263). Existen ciertas especies excavadoras que actúan activamente en la construcción del espeleotema, removiendo los granos minerales y creando depresiones o madrigueras donde refugiarse (Figuras 264-268).

Las localidades en las que se ha detectado la presencia de estos organismos son: Alto de Barruecos, Berrocal del Rugidero, Los Barruecos (Extremadura); Castelo da Furna (Portugal); Colegio Liqueño (Argentina); Fighosa (Galicia, España); Hyden Rock, Tcharkulda Rock (Australia).

4.1.4.6. Vertebrados

4.1.4.6.1. Anfibios

En las cuevas visitadas para la realización del presente estudio están presentes ejemplares del orden *Caudata*, representados por miembros de la familia *Salamandridae*, de costumbres muy higrófilas y lucífugas, pero sin modificaciones especiales para la vida hipógea. La salamandra común (*Salamandra salamandra*) (Figura 269) ha sido encontrada en la zona de entrada, rica en hojarasca y restos vegetales. Llega a alcanzar 20 cm de longitud y es inconfundible por su coloración de grandes manchas amarillas sobre fondo negro brillante. Se alimenta de insectos y es de costumbres terrícolas.

Otra especie perteneciente a familia *Salamandridae* encontrada en abundancia es la *Chioglossa lusitanica* (Figura 270). Una especie que se ha encontrado en las cuevas del noroeste de la Península Ibérica donde es endémica. Es el único representante de su género. Tiene el cuerpo muy alargado, delgado y casi cilíndrico (12-14 cm de longitud total). Se le encuentra principalmente en zonas de orografía accidentada, muy húmedas, con arroyos de acidez elevada y vegetación densa, suelo rocoso o arenoso y cubierto de musgo, y en general en aguas limpias, bien oxigenadas y con una alta

saturación de humedad. Por esto, está presente en las zonas abiertas y húmedas de las cuevas, lo que es muy significativo, ya que refleja la pureza de las aguas que bañan las cuevas, su escasa contaminación e identifica un medio donde esta especie está protegida. Este hecho es importante ya que se engloba en el libro rojo de las especies amenazadas con categoría de “vulnerable”.

En cuanto al orden de los Anuros, es habitual encontrar accidentalmente ejemplares adultos en las entradas de las cuevas. Un ejemplo es el sapo común, *Bufo bufo* (Figura 271). Se trata de un sapo de aspecto robusto y tamaño grande. En la región dorsal la piel es gruesa y con verrugas más o menos prominentes. La coloración de fondo dominante va desde pardusca hasta rojiza o anaranjada. Tradicionalmente reconocida como una especie única distribuida por todo el Paleártico occidental y que actualmente ocupa todos los hábitats peninsulares.

4.1.4.6.2. Reptiles

Se han encontrado ejemplares adultos de *Natrix natrix* (Figura 272) o culebra de collar, también llamada 'serpiente de agua'. Es una serpiente u ofidio no venenosa. Su longitud es de alrededor de 1 m. Su cuerpo es grueso y con cola afilada, y en su cabeza, de hocico redondeado, tiene ojos con pupilas redondas. Su color es muy variable y en los laterales, puede presentar manchas negras verticales, con un collar característico de color amarillento bordeado por detrás de una mancha negra. Se alimenta de anfibios (especialmente ranas, sapos, salamandras y tritones), aunque también puede llegar a cazar pequeños mamíferos, peces y pajarillos. Esta culebra puede encontrarse en toda Europa excepto en el norte. Se les puede ver a los lados de los ríos, pozos y lagos pequeños, en parajes secos y pedregosos, como son los entornos de las cuevas a estudio, en dunas costeras y bosques.

4.1.4.6.3. Mamíferos

Los mamíferos presentes en las cuevas a estudio corresponden a los quirópteros o murciélagos, animales nocturnos que en nuestras latitudes están presentes en las oscuridades de las cuevas y son más o menos gregarios; pudiendo, en algunos casos, llegar a formar colonias abundantes. Son de hábitos insectívoros (Galán, 1993) y se alimentan en el exterior, por lo que sólo pasan una parte de su vida en el interior de las cavidades (son troglóxenos regulares).

Las zonas ocupadas por ellos en las cuevas suelen contener depósitos de guano; sin embargo, los murciélagos más frecuentes en las cavidades estudiadas pertenecen a la familia *Rhinolophidae* (Figuras 273-274). Éstos son de costumbres menos gregarias, y por ello no producen grandes áreas de guano, ni permiten que se establezca en la cueva, fauna guanobia característica.

4.1.4.7. Otros restos biológicos

4.1.4.7.1. Polen

En las cuevas, es bastante frecuente el hallazgo de granos de polen que llegan transportados por el viento o con el agua infiltrada. El tamaño de un grano de polen se define en función del eje de mayor longitud y, a veces de la medida de su diámetro. Los granos de polen de las diferentes especies vegetales poseen tamaños muy diversos. Algunos de ellos apenas alcanzan los 10 μm , mientras que otros superan los 200 μm . Externamente la cubierta del grano de polen (esporodermis) está formada por dos capas: la exina y la intina. La intina es la capa más interna y su composición a base de celulosa y pectina le permite hidratarse y aumentar de tamaño. La exina es la capa más externa constituida básicamente por esporopolenina, uno de los compuestos más resistentes de la naturaleza; que permite que la cubierta de los granos de polen haya permanecido intacta en estos sedimentos millones de años. El aspecto de la superficie del grano de polen puede ser muy variado, y se debe a una combinación de las características de las subcapas de las que se compone la exina. Es así que estas estructuras darán en superficie diferentes morfologías clasificando los pólenes según las rugosidades que presenten en superficie, pudiendo ser estos: psilado, escábrido, reticulado, foveolado, perforado, regulado, estriado y fosulado.

Como se ha indicado anteriormente, en los espeleotemas se ha encontrado una gran variedad de pólenes permitiendo clasificar las diversas especies presentes a lo largo de todas las localidades (Tabla 5) gracias a su análisis en superficie mediante MEB. Los táxones encontrados son los siguientes:

- *Acacia* sp. (Figura 275). Género de plantas perteneciente a la familia de las leguminosas, representado por numerosas especies en su mayoría procedentes de Australia y África central, que se cultivan como árboles ornamentales en la Península. Cada grano de polen presenta una abertura cuadrangular o subcircular en el centro. El conjunto tiene forma aplanada, circular o ligeramente elíptica. El tamaño de la políada oscila entre 40 y 60- μm de diámetro mayor.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Gundaring (Western Australia).

- *Acer* sp. (Figura 276). Género de la familia de las aceráceas distribuido en su mayor parte por las regiones templadas del Hemisferio Norte. El grano de polen circular o triangular en vista polar, con las aberturas dispuestas en los ángulos, y elíptico en vista ecuatorial. Tamaño mediano, de entre 25 y 30 μm de diámetro.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Berrocal del Rugidero (Extremadura).

- *Ailanthus* sp. (Figura 277). Género de la familia de las simarubáceas. Es una planta heliófila que vegeta sobre suelos pobres, resistiendo veranos calurosos e inviernos rigurosos. El grano de polen es triangular en vista polar, con las aberturas dispuestas en los ángulos, subcircular en vista ecuatorial. Tamaño mediano, eje polar de 25 μm y diámetro ecuatorial de 22 μm y ligeramente granulado en su superficie. Su superficie, estriado-reticulada, pasa a ser casi estriada en las proximidades de las aberturas.

Este tipo de polen ha sido encontrado en Pampa de Achala (Argentina).

- *Alnus* sp. (Figura 278). Crece preferentemente en zonas húmedas, en márgenes de ríos, arroyos, praderas y zonas de umbría formando parte del bosque de galería. El grano de polen es muy característico, en visión polar de pentagonal a heptagonal, en función del número de aberturas, y en visión ecuatorial, de elíptico a plano convexo. Tamaño de pequeño a mediano, con un eje polar de 13 a 18 μm y un diámetro ecuatorial de 23 a 28 μm .

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal).

- *Amaranthaceae* sp. (Figura 279). El grano de polen es esférico, de tamaño de pequeño a mediano (de 10 a 30 μm de diámetro) y el número de poros, repartidos por su superficie, puede oscilar de 30 a 60. Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal).

- *Asteraceae* sp. (Figura 280). Son plantas herbáceas, excepcionalmente arbóreas, erectas, trepadoras o rastreras. Está ampliamente distribuida por todo el mundo (cosmopolita) pero se halla mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales. En visión ecuatorial los granos de polen son elípticos o circulares, mientras en la visión polar la forma es de circular a triangular. El tamaño medio de su polen es de 34 μm de diámetro y son esferoides.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Berrocal del Rugidero (Extremadura).

- *Carex* sp. (Figura 281). Pertence a la familia Cyperaceae donde géneros como *Cyperus* y *Scirpus* presentan una morfología polínica similar. El polen tiene simetría radial y es de circular a poliédrico en vista polar y piriforme en vista ecuatorial. Tiene un tamaño mediano de 35 a 48 μm . Este tipo de polen ha sido encontrado en: Señor de la Peña (Argentina).

- *Castanea* sp. (Figura 282). El castaño es un árbol corpulento que puede alcanzar los 35 m de altura. El polen es de pequeño tamaño (11-16 μm) y en visión polar parece más o menos circular y con poros.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal).

- *Cotoneaster* sp. (Figura 283). Es un arbusto caducifolio de hasta 2 m, crece en grietas de rocas y pedregales, claros de bosques húmedos y en matorrales del piso subalpino. El polen es esferoidal con aperturas y el diámetro mide de 20 a 34 μm .

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Berrocal del Rugidero (Extremadura) y Peña del Hierro (Huelva).

- *Fagus* sp. (Figura 284). Género de la familia de las fagáceas, se distribuye por montañas y vive en lugares con una alta humedad ambiental, lluviosos y umbríos, tanto sobre sustrato ácido como básico. El grano de polen es circular o subtriangular en visión polar, elíptico o circular en visión ecuatorial y de tamaño de mediano a grande. La superficie irregularmente perforada y con pequeñas elevaciones granuladas.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal).

- *Ligustrum* sp. (Figura 285). El género *Ligustrum* se incluye en la familia de las oleáceas. Son arbustos o arbolillos. El grano de polen es circular en vista polar y elíptico en vista ecuatorial, de tamaño mediano, con un eje polar de unas 26 a 30 μm y un diámetro ecuatorial de unas 25 a 32 μm .

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Murphy's Haystacks (South Australia) y Peña del Hierro (Huelva).

- *Olea* sp. (Figura 286). El género *Olea* de la familia *Oleaceae* es característico de la Región Mediterránea. Comprende árboles perennifolios y su polen subcircular-lobulado, de tamaño de pequeño a mediano (20 y 28 μm de diámetro), cuya superficie es reticulada.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Western Australia, Berrocal del Rugidero (Extremadura), Las Jaras (Córdoba) y Castelo da Furna (Portugal).

- *Pinus* sp. (Figura 287). El género *Pinus*, perteneciente a la familia de las pináceas, incluye un gran número de especies ampliamente distribuidas por el hemisferio norte. Comprende árboles perennifolios, resinosos, con copa piramidal o más o menos redondeada y con hojas aciculares. El polen es bisimétrico, con dos vesículas aeríferas laterales. El tamaño del corpus de mediano a grande en *Pinus* (34-60 μm). Superficie granulado-verrugosa. La morfología de sus granos de polen favorece la dispersión, lo que unido a su elevada producción polínica explica que sea un tipo polínico muy citado como aerovagante y por ello está muy ampliamente distribuido en las cuevas estudiadas.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: A Trapa (Galicia), Alto de Barruecos (Extremadura), Berrocal del Rugidero (Extremadura), Morcegos (Galicia), Peña del Hierro (Hueva), Porteliña (Galicia), Castelo da Furna (Portugal) y Hölick Grottan (Suecia).

- *Poaceae* sp. (Figura 288). Se trata de una familia de hierbas anuales o perennes que presenta distribución cosmopolita. El polen es de circular a subcircular y mide entre 25 y 40 μm de diámetro; aunque los cereales cultivados tienen un tamaño mucho mayor, llegando incluso hasta 100 μm y con superficie granulada.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Pampa de Achala (Argentina).

- *Quercus* sp. (Figura 289). Este género perteneciente a la familia de las fagáceas, incluye especies que forman bosques ampliamente extendidos en Eurasia y América. Polen casi circular o elíptico de tamaño de pequeño a mediano (25-30 μm).

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Berrocal del Rugidero (Extremadura) y Campofrío (Hueva).

- *Rosaceae* sp. (Figura 290). Esta familia es una de las más importantes desde el punto de vista económico y está distribuida por todas las regiones del mundo. Constituyen un conjunto de plantas que cuando son silvestres o naturalizadas, se encuentran en bordes y claros de bosques formando setos y zarzas. El grano de polen es circular, subcircular o subtriangular en vista polar, con las aberturas situadas en los ángulos, y subelíptico. Tamaño mediano, eje polar de 16-40 μm y

diámetro ecuatorial de 19 a 50 μm con estrías dispuestas irregularmente.

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal).

- *Salix* sp. (Figura 291). Es un género de plantas perteneciente a la familia de las salicáceas, que se distribuye por todo el hemisferio norte, que habitan en bosques húmedos y bordes de ríos. El grano de polen es circularlobulado. Tamaño de pequeño a mediano (13 a 28 μm).

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Castelo da Furna (Portugal) y Peña del Hierro (Hueva).

- *Tamarix* sp. (Figura 292). Género perteneciente a la familia de las tamaricáceas que incluye plantas distribuidas por las regiones templadas y subtropicales del globo, principalmente en la región Mediterránea, donde prospera en bordes de ríos, arroyos o ramblas térmicas sobre suelos limosos-arenosos y húmedos, con frecuencia salinizados. Se trata de arbustos y pequeños árboles. Polen triangular, con los lados convexos, en visión polar y elíptico en visión ecuatorial. Tamaño pequeño (15 a 20 μm de diámetro).

Este tipo de polen ha sido encontrado en: Berrocal del Rugidero (Extremadura).

	Localidad	POLEN															
		Acacia	Acer	Allanthus	Alnus	Amonitifloraceae	Asteraceae	Cistaceae	Cornaceae	Euphorbiaceae	Fagus	Hibiscus	Lipanthum	Olea	Pinus	Poaceae	Quercus
Argentina																	
Australia	Gundahg																
	Murphy's Haystacks																
Austria																	
España	A Trapa (Galicia)																
	Alto de Barnecos																
	(Extremadura)																
	Berrocal del Rágüero																
	(Extremadura)																
	Campoñito (Navarra)																
	Las Jaras (Córdoba)																
	Morcasos (Galicia)																
	Pella del Hierro (Navarra)																
Portugal	Ponteinha (Goitia)																
Suecia	Castelo de Huma																
	Fallberget																
	Fruberget																
	Hölick Grottan																

Tabla 5. Distribución, por localidades, de los diferentes tipos polínicos encontrados en las cuevas de rocas magmáticas estudiadas.

4.1.4.7.2. Fitolitos

La palabra fitolito proviene del griego φυτός-λίθος, que significa planta pétrea. Los fitolitos son biomineralizaciones de sílice, de una medida en torno a 7-42 μm (Scurfield *et al.*, 1974), generadas en el tejido celular de las plantas. La sílice se mantiene en estado líquido (H_4SiO_4) en el agua que las plantas absorben, y es transportada a las zonas aéreas de su organismo. Allí parte de esa sílice disuelta se cristaliza, convirtiéndose en dióxido de sílice (SiO_2), en la pared celular, en los espacios intercelulares, o bien, en el interior de la célula; pasando a formar parte del sedimento una vez la planta desaparece (Piperno, 2006).

En las muestras estudiadas en esta tesis han sido identificados según su morfología fitolitos probablemente pertenecientes al género *Carex* sp. (Guo *et al.*, 2012) (Figura 293). Este género pertenece a la familia *Cyperaceae*, y está representado en América del Sur por más de 200 especies; de las cuales, 90 aparecen en Pampa de Achala (Argentina), lugar de donde procede la muestra donde se ha encontrado. En la Península, también se han encontrado posibles fitolitos: en Castelo da Furna (Portugal) (Figura 294), aunque por el deterioro mencionado anteriormente, es difícil la identificación de la especie a la que pertenece.

4.2. RESULTADOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

4.2.1. Mineralogía

La aplicación de Difracción de Rayos X ha permitido identificar que el mineral mayoritario que constituye los espeleotemas es el ópalo A. El ópalo A es una fase metaestable y la más amorfa del grupo de minerales opalinos y en difracción de rayos-X muestra una banda centrada entre los 19 y 25° 2 θ (Jones & Segnit, 1971) que se puede observar en los difractogramas de las muestras estudiadas (Figura 295).

4.3. RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (ANÁLISIS GENÉTICOS)

Los resultados sobre la biodiversidad de microorganismos (bacterias y arqueas) en las cuevas estudiadas, fruto del análisis mediante técnicas de biología molecular: extracción del ADN y pirosecuenciación de ADN de las cuevas: “A Furna” (Figura 296) y “O Forno” (Figura 297), Castelo da Furna (Boivão, Valença do Minho) (Vidal Romaní *et al.*, 2015) han sido los siguientes:

4.3.1. Análisis cuantitativos

Mediante el primer análisis bioinformático, con Qiime 1.7.0 (Caporaso *et al.*, 2010), el número bruto de secuencias fue de 423632 en forma de unidades taxonómicas operativas (OTUs). Seguidamente, se realizó un filtro para escoger las de mayor calidad y se obtuvieron un total de 384689 OTUs, distribuidas en las muestras de la siguiente forma: C1: 37003, C2: 59326, C3: 45404, A1: 52574, A2: 41995, A3: 41173, A4: 59432 y Blanco: 47782. Después de este filtro de calidad, la longitud mínima, máxima y media en pares de bases fue 218,0; 563,0 y 410,6 respectivamente.

Respecto al Análisis bioinformático realizado con SILVAngs 1.2 (Quast *et al.*, 2013), el número de secuencias de calidad fue de 263103. Distribuidas en las muestras de la siguiente forma: C1: 30606, C2: 33899, C3: 30371, A1: 34389, A2: 33017, A3: 41173, A4: 33486 y Blanco: 33899. En este caso, la longitud mínima, máxima y media en pares de bases fue 188,0; 220,0 y 215,0 respectivamente. Las secuencias clasificadas fueron 262519 (99,7% del total) y las "No identificadas" 429 (0,16% del total).

En cuanto a la similitud de los OTUs de las distintas muestras, es 82% de media, mostrando generalmente una similitud de 79,5 % a 85, 6% según muestra el gráfico (Figura 298). La mayor similitud de OTUs entre las diferentes muestras es del 100% (con 38093 pares coincidentes) y la menor de 0% (con 2536 pares coincidentes). Sin embargo, dentro de los OTUs de cada muestra no existen similitudes del 0%, osea, no existe total discordancia entre los OTUs presentes dentro de una muestra, lo que es esperable. Su similitud máxima también está en 100% y la media también ronda el 82%, lo que muestra que tanto los OTUs entre muestras como los de la misma muestra siguen un patrón homogéneo genéticamente. Sin embargo, la menor similitud es el valor más dispar entre las diferentes muestras mostrando una media de 47% que se extiende desde similitudes de 38,9% a 60,3% (datos obtenidos de los análisis con Silvangs).

4.3.2. Biodiversidad bacteriana y abundancia, su rol en los espeleotemas

La abundancia y distribución de los filos de bacterias y arqueas se muestran en la Tabla 6 y en los Gráficos 22 A-D y 23 A-C. Se ha observado una gran biodiversidad, contabilizándose 29 filos de bacterias y 2 de Arqueas (Tabla 6); apareciendo una media de 18 filos en cada punto de muestreo. Aunque muestras, como la A3,

presentan una biodiversidad destacada (presencia de 26 filos) si se compara con las otras muestras.

En cuanto a la diversidad de géneros de cada filo se han encontrado hasta 346 géneros diferentes de Bacterias (343) y Arqueas (3). El filo con mayor diversidad es *Proteobacteria* con 116 géneros, siguiéndole *Actinobacteria* (75), *Firmicutes* (36), *Chloroflexi* (22), *Acidobacteria* (14), *Bacteroidetes* (11), *Planctomycetes* (11), *Cyanobacteria* (9), *Verrucomicrobia* (9), *Chlamydiae* (7), *Gemmatimonadetes* (4), OD1 (4), *Armatimonadetes* (3), *Nitrospirae* (3), *TM7* (3), *AD3* (2), *Crenarchaeota* (2), *Fusobacteria* (2), *[Thermi]* (1), *Chlorobi* (1), *Elusimicrobia* (1), *Euryarchaeota* (1), *FBP* (1), *FCPU426* (1), *GAL15* (1), *GN02* (1), *OP3* (1), *Spirochaetes* (1), *Tenericutes* (1), *TM6* (1) y *WPS-2* (1) (Gráfico 24).

Comparando la abundancia de los filos frente a la diversidad de cada uno (Gráfico 24), las Actinobacterias, las más abundantes, sólo presentan un total de 75 géneros frente al filo Proteobacteria que con menor abundancia presenta 116 géneros diferentes, siendo el de mayor biodiversidad de especies en estos medios. También existen otros grupos con menor abundancia que, sin embargo, presentan gran diversidad en el número de géneros. Es el caso de Firmicutes, con 36 géneros diferentes y una abundancia casi anecdótica. Al igual que otros taxones como Bacteroidetes y Chlamydiae con 11 y 7 géneros diferentes respectivamente.

Los taxones de familias de bacterias más representativos en bioespeleotemas pertenecen a las familias *Acetobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*), y *Pseudonocardiaceae*. Las *Acetobacteraceae*, son bacterias gram negativas aerobias y ácido acéticas. Muchas de estas especies han sido recientemente descritas y están relacionadas con bacterias acidófilas. En cuanto a los géneros que abundan son *Acidiphilium*, *Pseudonocardia*, *Mycobacterium*, *Dyella*, *DA101*, *Geodermatophilus* y *Streptophyta*. También se sabe que existen otros no identificados pertenecientes a los órdenes *Acidimicrobiales*, *Ellin6537*, *B12-WMSP1* y *Actinomycetales*; y a las familias *Acidobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Conexibacteraceae*, *Nocardiaceae*, *Frankiaceae*, *Rubrobacteraceae*, *Thermogemmatissporaceae*, *Kineosporiaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Ellin6075*, *Isosphaeraceae*, *Nitrospira* y *Solibacteraceae*; así como al filo *WPS-2*, y a la clase *TM7-1*.

En cuanto a la abundancia, el filo *Actinobacteria* es el más abundante en todas las muestras, seguidas por las Proteobacterias y por *Acidobacteria* (Gráfico 25), al que le siguen otros como *WPS-2*, *TM7*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*,

Nitrospirae, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* y *Chlamidiae*. También están presentes otros taxones como *Elusimicrobia*, *GAL15*, [*Thermi*], *OP3*, *Tenericutes*, *Chlorobi*, *GN02*, *FBP*, *FCPU426*, *Spirochaetes*, *Armatimonadetes*, *Fusobacteria*, *AD3*, *TM6*, *OD1*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*; así como las Arqueas: *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*. También se han detectado abundancia de otras secuencias bacterianas que no corresponden a ninguno de los taxones descritos hasta el momento (unidentified) (Tabla 6).

ABUNDANCIA DE LOS DIFERENTES FILOS EN LAS CUEVAS								
Cueva	A Furna			O Forno				TOTAL %
	int	ext		int	ext			
Filo/ Muestra	C1	C2	C3	A4	A3	A2	A1	
Acidobacteria	13,37	0,14	10,45	22,42	9,00	6,71	1,20	9,04
Actinobacteria	61,36	92,92	41,61	44,04	33,17	46,66	11,98	47,39
AD3			0,01	0,01	0,06			0,01
Archaea_Crenarchaeota			0,05	0,01	0,03			0,01
Archaea_Euryarchaeota							0,02	0,00
Armatimonadetes			0,03		0,02			0,01
Bacteroidetes	0,24	0,02	0,02	0,04	0,52	0,01	0,13	0,14
Chlamydiae	0,06	0,01	0,02	0,13	0,72	0,47	0,67	0,30
Chlorobi			0,01					0,00
Chloroflexi	1,19	0,06	10,98	0,96	3,07	0,15	0,05	2,35
Cyanobacteria	0,02	0,04	0,17	0,07	0,28	0,14	11,41	1,73
Elusimicrobia			0,00					0,00
FBP					0,01			0,00
FCPU426				0,00	0,02			0,00
Firmicutes	0,04	0,11	0,78	0,43	1,70	0,27	1,63	0,71
Fusobacteria		0,00		0,00	0,07			0,01
GAL15			0,00					0,00
Gemmatimonadetes	0,20	0,01	0,10	0,02	0,45		0,03	0,12
GN02					0,01			0,00
Nitrospirae	0,17	0,00	1,57	3,33	2,28	0,35	0,00	1,10
OD1	0,01			0,40	0,17	0,01		0,08
OP3					0,01			0,00
Planctomycetes	2,22	0,82	1,77	1,85	1,02	0,46		1,16
Proteobacteria	15,99	5,04	16,45	25,16	45,64	25,76	72,56	29,51
Spirochaetes					0,03			0,00
Tenericutes					0,01			0,00
Thermi	0,01							0,00
TM6	0,01		0,00	0,02	0,16	0,08	0,00	0,04
TM7	0,12	0,76	0,12	0,01	0,51	16,71	0,00	2,60
Unidentified	0,03	0,01	0,02	0,02	0,06	0,10	0,24	0,07
Verrucomicrobia	4,79		0,01	0,01	0,20		0,06	0,72
WPS-2	0,16	0,06	15,81	1,07	0,87	2,12		2,87

Tabla 6. Abundancia de los filos bacterianos y de Arqueas en las diferentes cuevas estudiadas de Castelo da Furna (Portugal).

4.3.2.1. Arqueas

En cuanto a las Arqueas se han identificado 3 clados diferentes, entre ellos, miembros de *Thaumarchaeota*, cuya presencia sólo había sido citada en cuevas submarinas (Tetu *et al.*, 2013).

4.3.2.2. Actinobacterias

El filo *Actinobacteria* es el más abundante en todas las muestras (Gráfico 25) con la excepción de la que corresponde a la entrada (A1) (Gráfico 22A) y al medio (A3) (Gráfico 22C) de la cueva de “O Forno” donde es el *Proteobacteria*. Además, la abundancia de las actinobacterias destaca sobre el resto de taxones en ciertos puntos como C2 (Gráfico 23B) y C1 (Gráfico 23A) en la cueva de “A Furna”.

Un género con gran abundancia pertenece a la familia *Pseudonocardiaceae*. Dentro de este taxón se encuentran organismos como el género *Pseudonocardia*. Actinobacterias que parasitan artrópodos como hormigas y se alimentan de sus secreciones glandulares, dando un aspecto blanquecino a su superficie. Por esta razón, las actinobacterias que habitan estas cuevas podrían desarrollarse gracias a los artrópodos presentes en ellas y a los que parasitan.

Mycobacterium también es un representante de los espeleotemas estudiados y es el género típico de su familia. Pertenece a las actinobacterias cuyo filo comprende numerosas especies asociadas a enfermedades humanas como la tuberculosis. Son bastones rectos o curvados que algunas veces forman filamentos o micelios (los cuales son típicos en la superficie del bioespeleotema según los análisis al MEB), a veces apareciendo fragmentados en formas cocoides y aerofílicos. Este género contiene agentes quimioterapéuticos y muchas de sus especies son características de suelos y agua. Sin embargo, los mayores reservorios de este género se asocian a los animales de sangre caliente, por lo que es posible que los quirópteros estén relacionados con su presencia en las cuevas.

Otro género presente en las muestras pertenece a la familia *Frankiaceae*. *Frankia* es el género tipo y contiene simbioses de plantas. Otro de sus géneros característicos es *Geodermatophilus* que ocupa suelos y superficies rocosas; típicos *actinomycetes* de suelos y habitantes de los nódulos de las raíces de las plantas.

El género *Geodermatophilus*, también es típico de suelos y de superficies rocosas, es por eso que se detectado su presencia. Es Gram positivo y su metabolismo es quimioorganotrofo. Ha sido también aislado en ambientes extremos como desiertos y suelos a gran altitud y tiene un metabolismo atípico (es manganeso oxidante) y está asociados con las formaciones de varnices negros y marrones de costras de rocas en diversos ambientes (Hungate *et al.*, 1987) y en biofilms (Singh *et al.*, 2003).

El Orden *Actinomycetales* (*Actinobacteria*) tiene una presencia destacable y se caracteriza por su morfología de bastones rectos o ligeramente curvados, gram positivos, no móviles que en ocasiones dan filamentos ramificados de 1 micra de diámetro. La fragmentación de estos filamentos produce bastones o formas cocoides, cuyas morfologías han sido encontradas en los análisis al MEB. Algunos también son cocabacilos o cocoides y dependiendo de las especies, las células son de hasta 0,5 µm de ancho. Las colonias pueden ser filamentosas dando una apariencia más o menos de micelio, aunque no suele formarse micelio aéreo. Producen colonias blancas o grises (cuya coloración abunda en la superficie de los espeleotemas) y todos sus miembros son quimioorganotrofos.

La familia *Conexibacteraceae*, dentro de las *Actinobacterias* también está presente. Su género tipo es *Conixibacter* y son bastones pequeños y flagelados, gram positivos, que no forman endosporas, aerobios y quimioorganotrofos, característica principal de las bacterias presentes en los espeleotemas estudiados.

También existe abundancia notable de la familia de actinobacterias *Rubrobacteraceae*. *Rubrobacter* es el género tipo, el cual se caracteriza por ser bacilos irregulares gram positivos e inmóviles, de 0,8-1,0 µm x 1,0-4,0 µm de tamaño; que pueden presentar formas cocoides y son aerobios obligados que crecen en pH de neutros a básicos.

En la familia de actinobacterias *Kineosporiaceae* también muestra abundancia, siendo el género tipo, *Kineosporia*; una gram positiva aerobia cuyas células forman proyecciones centrales con hifas vegetativas, a veces acompañadas de racimos de esporas. Las esporas son de esféricas a ovoides o piriformes y móviles con pelos o flagelos polares, posiblemente fotografiadas en los análisis con MEB. Son aerobios y quimioorganotrofos como la mayor parte de los organismos presentes descritos.

Otro taxón de gran abundancia pertenece al orden *Acidimicrobiales* un grupo no cultivable (como la inmensa mayoría de las *Actinobacteria*) habitual en aguas de minas en rocas félsicas y en fuentes hidrotermales.

4.3.2.3. Proteobacterias

Aunque el filo Proteobacterias s.l. es el segundo con mayor abundancia se trata, casi exclusivamente, de la Clase *Alphaproteobacteria* (*Alfa*-, *Beta*-, o *Gammaproteobacteria* son las más abundantes en nuestras muestras). Estas son típicas bacterias desnitrificantes caracterizadas por contener especies fototróficas que oxidan hierro. La mayoría de ellas son aerobias obligadas o anaerobias facultativas, y muchas de ellas, oligotróficas con tendencia a crecer en ambientes pobres en nutrientes, como son los medios cavernícolas. De los géneros de *Alphaproteobacteria* encontrados destacan los siguientes: *Bradyrhizobium* que es un género que forma nódulos en legumbres; *Methylobacterium*, un metilotrofo típico de plantas y suelos; *Azospirillum*, un diazotrofo aerobico obligado y que fija nitrógeno atmosférico y *Sphingomonas* que realiza degradación aeróbica de compuestos aromáticos orgánicos y biodegradación y *Rhizobiales*, que es el mayor grupo y más diverso metabólicamente de *Alphaproteobacteria*. Otro género característico de nuestras cuevas es *Acidiphilium*, que son aerobios y acidófilos (crecen en pH de 2,5 a 5,9), mesofílicos y quimiorganotrofos; habituales en ambientes metálicos ácidos como aguas de minas de sulfuros (pirita).

Una familia característica de estos espeleotemas es *Xanthomonadaceae*, que contiene doce géneros, siendo el más característico *Xanthomonas* que se caracterizan por ser bastones rectos individuales o en parejas móviles con un flagelo polar y obligatoriamente aerobios. Sus colonias son amarillas y son quimioorganotrofos. Este organismo oxida compuestos como sulfitos o tiosulfato y es un quimiolitioautótrofo que puede usar sales de amonio como fuente de nitrógeno.

El género *Dyella*, aparece en nuestras muestras, lo que no es extraño dado que son especies propias de suelos, gram negativas, móviles por un flagelo polar, aerobias y no formadoras de esporas con forma de bacilos (Weon *et al.*, 2009).

4.3.2.4. Acidobacterias

Destacan por su abundancia miembros no identificados de la familia *Acidobacteriaceae*, y géneros como *Acidobacterium*, *Edaphobacter* y *Terriglobus*. Sus células suelen ser bastones aislados o en parejas y en pequeñas cadenas. Aerobios y acidofílicos dado que crecen a pH de 3 a 6.

Otro de los taxones abundantes de Acidobacterias es la familia *Solibacteraceae*, que es abundante en suelos ácidos con emisiones de óxidos de nitrógeno (Xu *et al.*, 2014). Así como la familia *Thermogemmatissporaceae* que son termofílicas gram positivas que forman esporas y micelios aerobios, normalmente muestreados en suelos de ambientes geotermales (Yabe *et al.*, 2011).

Es destacable la presencia de géneros de las familias *Ellin6075*, acidobacterias en algunas ocasiones muy abundantes en ciertas muestras, caracterizadas por ser bacterias noveles no cultivables típicas de suelos (Joseph *et al.*, 2003).

4.3.2.5. Chloroflexi

Dentro de este filo, se han encontrado miembros de la Clase *Ktedonobacteria*, hasta ahora sólo encontrados en cuevas de ortocuarzitas (Barton *et al.*, 2014).

Un taxon cuya presencia destaca por ser novel es *B12-WMSP1*; que han sido encontradas previamente en suelos de tundra (Costello & Schmidt, 2006); así como el orden *Ellin6537* el cual alberga numerosas bacterias también aisladas en suelos (Davis *et al.*, 2011).

4.3.2.6. Firmicutes

Se han identificado muchas bacterias afines a *Acetobacterium*, que son bacterias acetogénicas que producen acetato (ácido con un activo rol en la biometeorización de la roca). Estas son capaces de crecer quimiorganotróficamente, mediante la fermentación de azúcares, o quimiolitotróficamente y autotróficamente, a través de la reducción del dióxido de carbono con hidrógeno como donador de electrones, produciendo acetato. Los organismos acetógenos son anaerobios obligados y podrían crecer en estas condiciones, protegidos del oxígeno, en el seno del hidrogel de silicio. La mayor diversidad de estos es encuentra en el filo *Firmicutes*, pero también en *Spirochaetes* y *Acidobacteria*.

4.3.2.7. Pertenecientes a otros filos bacterianos

Se ha identificado un género (*Leptotrichia*) (Filo *Fusobacteria*) el cual está asociado a grietas profundas de granito relacionadas con acuíferos, y es responsable de los óxidos de hierro (Pedersen, 1997); quizás presente en sedimentos de cuevas donde la presencia de Fe en disolución es mayor (pigotita) (Vidal Romaní *et al.*, 2007). Este género es afín a los encontrados por Daza & Bustillo (2014b) (*Leptothrix*, *Gallionella*),

el cual también sería de esperar en nuestras cuevas debido a su metabolismo quimiolitotótrofo, mediante el que extraen la energía fijando carbono inorgánico de la superficie rocosa.

Del género *Nitrospira* (Filo *Nitrospirae*) también existe una abundancia notable, dado que se encuentra habitualmente en agua dulce y es capaz de crecer litoautótrofamente ya que su metabolismo es nitrito oxidante. Es un género ubicuo y habitual de suelos de permafrost, de cultivos y viven en un amplio rango de hábitats, incluyendo cuevas y fuentes termales. Su filogenia se asocia a ambientes acuáticos. Son bacterias nitrificantes, quimiolitótrofas que oxidan NH_3 a NO_2^- o NO_2^- a NO_3^- . Mientras que los oxidantes de amonio son las Proteobacterias y las Thaumarchaeota, los nitrito oxidantes son las Proteobacterias y *Nitrospira*. Este género crece en los mismos ambientes que *Nitrobacter* pero es mucho más abundante que este en la naturaleza, y mucho más nitritooxidantes en ambientes ricos en nitrógeno y, sobre todo en amonio.

Es destacable, también, la presencia de la familia *Isosphaeraceae* (Filo *Planctomycetes*) dado que también son bacterias noveles no cultivables típicas de suelos (Joseph *et al.*, 2003). Así como el género *DA101*, que pertenece al filo *Verrucomicrobia* y se caracteriza por no ser cultivable y típico de suelos de pradera (Felske & Akkermans, 1998).

El reciente filo *TM7-1* que son bacterias no cultivables y ubicuas, asociadas a suelos, también es típico de estos ambientes. Son anaerobios facultativos relacionados con suelos ácidos con hierro, azufre, titanio y cobre.

4.3.3. Diferencias entre las cuevas estudiadas

Se ha demostrado que la diversidad bacteriana se ve ligeramente influenciada por el ambiente de la cueva en el que se ha realizado el punto de muestreo, siendo el principal factor limitante la luminosidad. La zona más iluminada es la situada en la entrada de la cueva (muestra A1) y encontrándose menos iluminadas progresivamente las muestras: A2, A3 y A4, en la cueva de “O Forno” (Figura 297) (Gráficos 22 A-D). En la cueva de “A Forna” (Figura 296) también estarán poco iluminadas, por ser puntos de muestreo en zonas profundas: C1, C2 y C3 (Gráficos 23 A-C).

Pese a tratarse de un ambiente oligotrofo se ha visto que las muestras presentan gran biodiversidad, observándose una media de 145 géneros diferentes en las muestras de “A Forna” y de 129 en “O Forno”, destacando el punto A3 por su mayor diversidad con

214 y el A1 por solo contener 83 géneros diferentes (según *Greengenes*). Estas diferencias se deben a que el punto A1, es el que presenta mayor exposición a la luz solar y algunas bacterias podrían no ser resistentes a estas condiciones; mientras que otras fotosintéticas, encuentran en esta zona su nicho de mayor éxito, y utilizarán esta energía para desarrollarse masivamente y competir por el espacio con otras que crecen en menor abundancia o no crecen en ese punto.

Existe una clara diferencia entre las cuevas estudiadas, ya que mientras en “A Furna” (Gráficos 23 A-C) abundan las *Actinobacteria*, las más abundantes en “O Forno” (Gráficos 22 A y C) son las *Proteobacteria*. Debido a la presencia en el primer caso del orden *Actinomycetales* y, en el segundo caso, a la mayor abundancia de *Alphaproteobacteria*. Estos dos clados coinciden con resultados obtenidos para cuevas en cuarcita donde son los microorganismos también más abundantes (Barton *et al.*, 2014).

En cuanto a la cueva de “A Furna” (Figura 296), se detectan diferencias entre los dos niveles de muestreo, dado que en el primer nivel (muestras C1 y C2) (Gráficos 23A y 23B respectivamente) se sigue la tendencia de gran abundancia de Actinobacterias sobre los otros grupos. Sin embargo, el tercer punto de muestreo (C3) (Gráfico 23C), a pesar de que la mayor abundancia la presenta también este taxón, hay otros grupos con un gran porcentaje como las Proteobacterias, WPS-2, Chloroflexi, Acidobacteria y otros en menor abundancia. Esta mayor diversidad en el segundo nivel de la cueva podría ser fruto de que este punto de muestreo se encuentra en un entorno abierto al exterior que recibe mayor aporte de materia orgánica para el crecimiento de los microorganismos. Chloroflexi es abundante en C3 (“A Furna”) a diferencia del resto de muestras y esto podría ser debido a que algunos de los componentes de este grupo son fotosintetizadores; sin embargo, la presencia de este filo en las zonas más expuestas no se cumple en la cueva “O Forno”. Otra de las mayores diferencias apreciables entre las dos cuevas es la abundancia de las Proteobacterias, dado que en la cueva de “O Forno” es la mayor.

Otra de las diferencias que se percibe entre ambas cuevas es la presencia desigual de Cyanobacteria. En “O Forno” la mayor abundancia de cianobacterias (Gráfico 22A) se debe a que la muestra fue tomada a la entrada de la cueva (A1); sin embargo, las Cyanobacterias están presentes en la totalidad de las muestras y hasta en las zonas más oscuras de las cuevas. Por el contrario, en “A Furna” éstas no presentan abundancia destacable ya que no se han tomado muestras en la entrada a la cueva y

ni siquiera presentan una gran abundancia en la muestra más próxima al exterior (C3) (Gráfico 23C).

Finalmente, una importante similitud entre ambas cuevas es la presencia de bacterias asociadas a sulfur-biomineralización, sulfuro oxidantes o sulfuro reductoras representadas aquí por el género *Shewanella*, previamente encontradas en cuevas por Gleeson *et al.* (2011). Encontradas específicamente en las muestras: A3 (Gráfico 26C), A4 (Gráfico 26D) y C2 (Gráfico 27B).

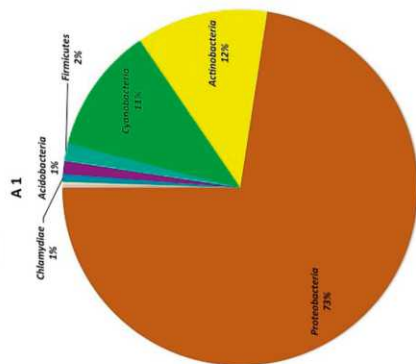


Gráfico 22A

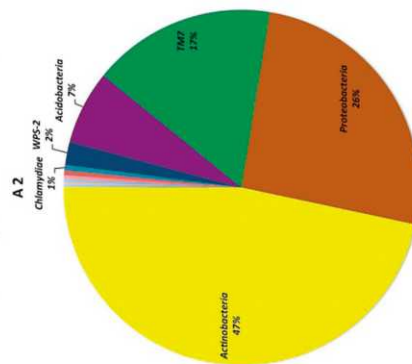


Gráfico 22B

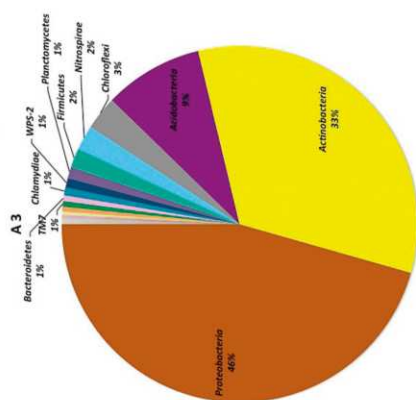


Gráfico 22C

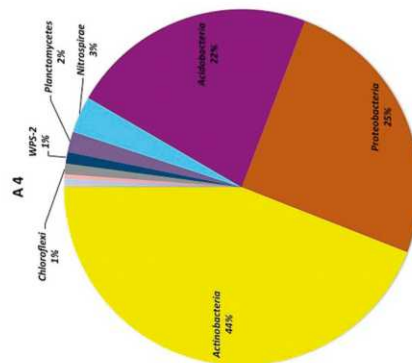


Gráfico 22D

Gráficos 22 A-D: Abundancia relativa de los filos bacterianos entre las diferentes muestras tomadas en la cueva de "O Forno" (Castelo da Furna, Portugal) desde el punto de muestreo más externo (4A) al más interno (4D).

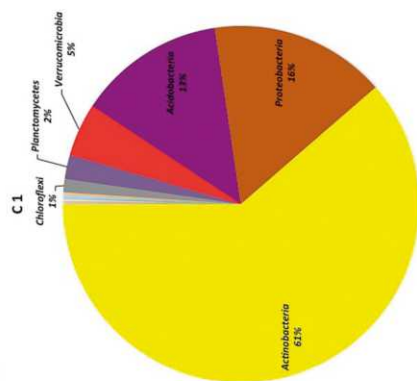


Gráfico 23A

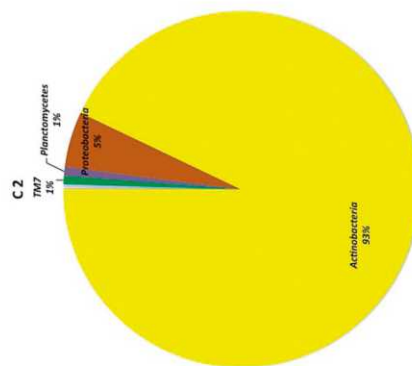


Gráfico 23B

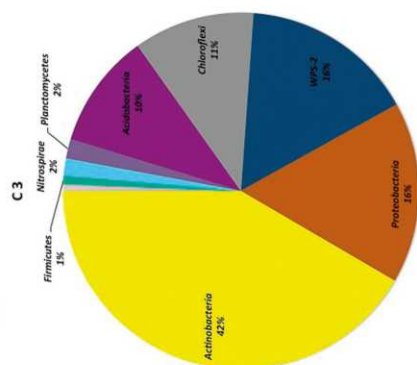


Gráfico 23C

Gráficos 23 A-C: Abundancia relativa de los filos bacterianos entre las diferentes muestras tomadas en la cueva de "A Furna" (Castelo da Furna, Portugal).

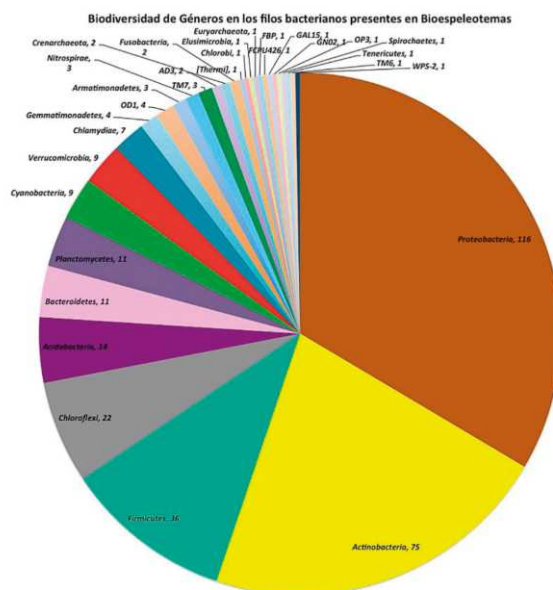


Gráfico 24

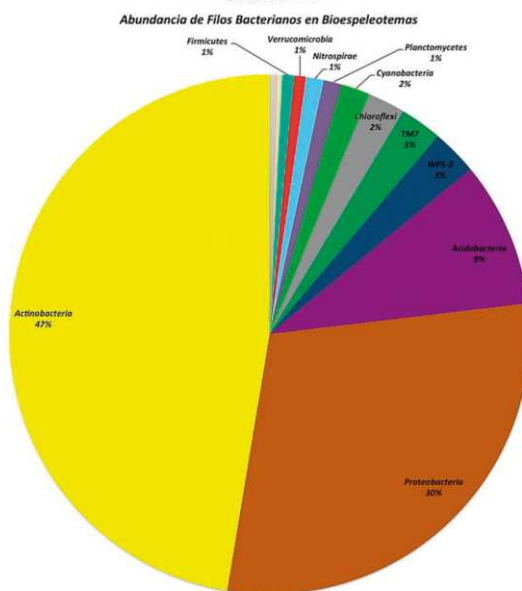


Gráfico 25

Gráficos 24-25: 24. Abundancia de géneros o biodiversidad dentro de cada filo bacteriano. 25. Abundancia de los diferentes filos bacterianos en los Bioespeleotemas de cuevas graníticas.

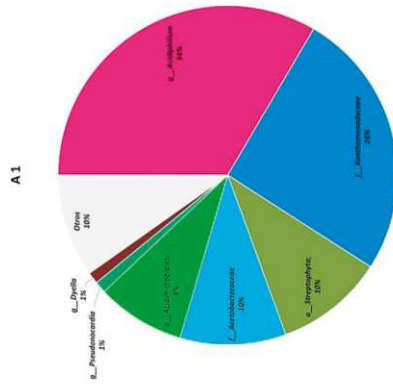


Gráfico 26A

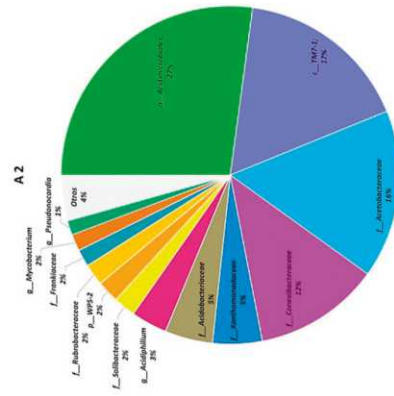


Gráfico 26B

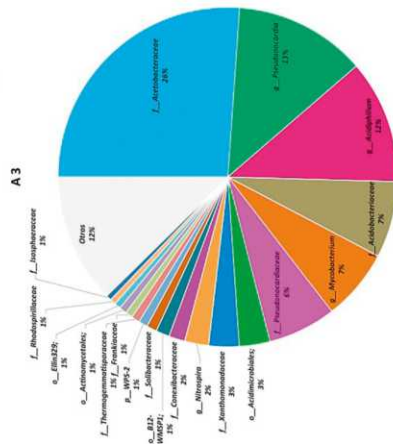


Gráfico 26C

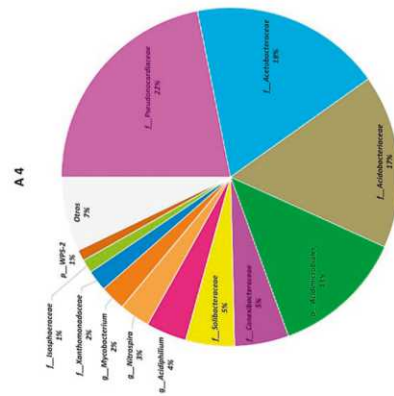


Gráfico 26D

Gráficos 26 A- D: A. Géneros o taxones más abundantes encontrados en la cueva "O Forno" (Castelo da Furna, Portugal), muestra A1. B. Géneros o taxones más abundantes encontrados en la cueva "O Forno" (Castelo da Furna, Portugal), muestra A2. C. Géneros o taxones más abundantes encontrados en la cueva "O Forno" (Castelo da Furna, Portugal), muestra A3. D. Géneros o taxones más abundantes encontrados en la cueva "O Forno" (Castelo da Furna, Portugal), muestra A4.

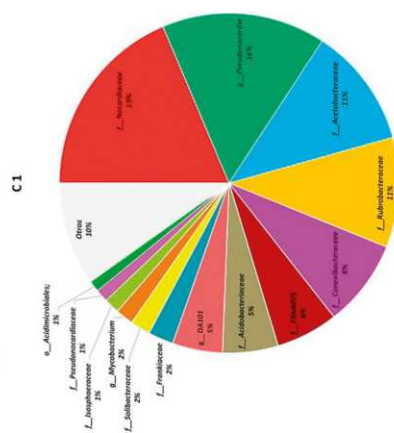


Gráfico 27A

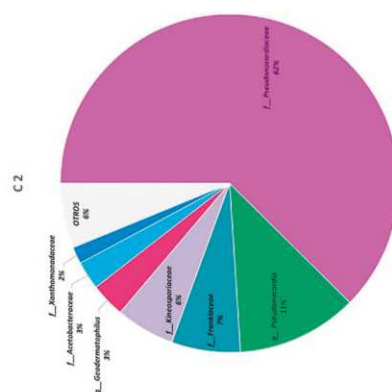


Gráfico 27B

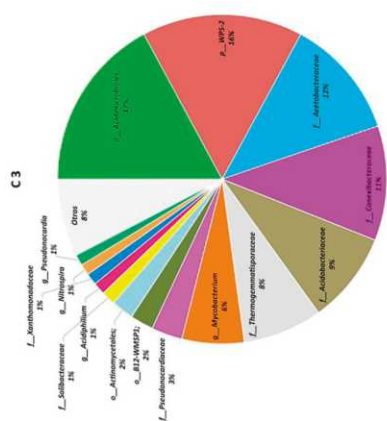


Gráfico 27C

Gráficos 27 A - C: Géneros más abundantes encontrados en la cueva "A Furna" (Castelo da Furna, Portugal) en: A. Muestra C1. B. Muestra C2. C. Muestra C3.



Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6

Figuras 1-6: 1. Espeleotema cilíndrico individual sobre cuarzo. Cueva A Cunchosa, Galicia. 2, 4. Espeleotemas cilíndricos. Castelo da Furna (Portugal). 3. Espeleotemas cilíndricos. Albarellos (Galicia, España). 5-6. Microgours que recubren la superficie del espeleotema. Trollhålet (Suecia).



Figura 7

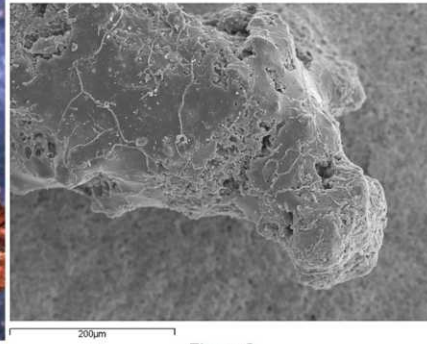


Figura 8

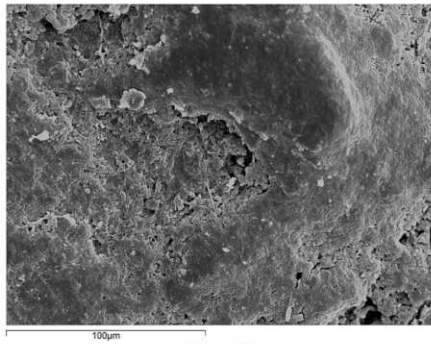


Figura 9

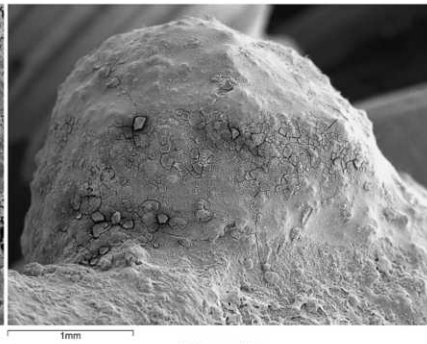


Figura 10

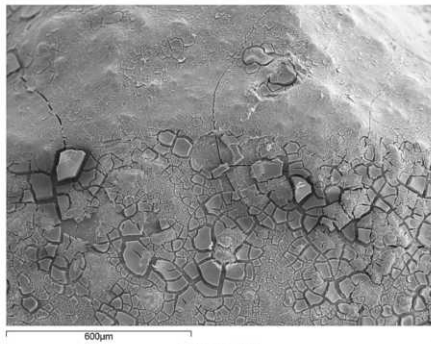


Figura 11

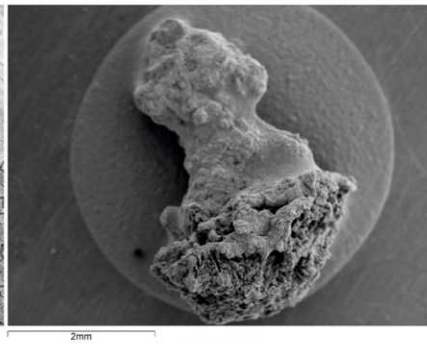


Figura 12

Figuras 7-12: 7. Espeleotemas cilíndricos. Tcharkulda Rock (Australia). 8. Espeleotemas cilíndricos al MEB. Skálboberget (Suecia). 9. Ópalo A cementando la superficie de bioespeleotemas. Austria. 10-11. Grietas de retracción del ópalo en el extremo del espeleotema. Porteliña (Galicia, España). 12. Espeleotemas cilíndricos de aspecto fungiforme cubiertos de maclas de yeso. Drömgrottan (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)



Figura 13

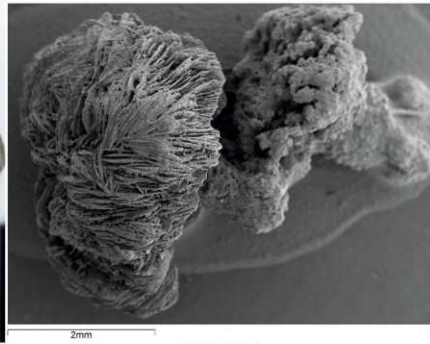


Figura 14



Figura 15

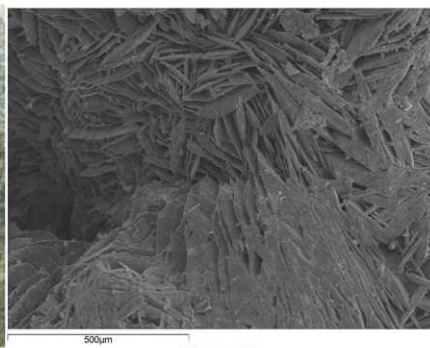


Figura 16

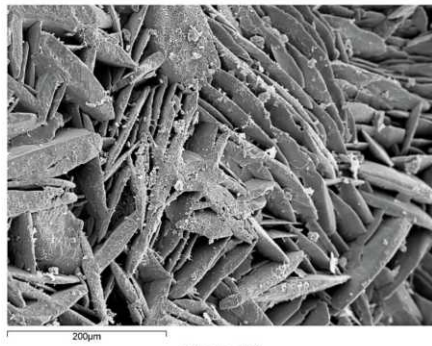


Figura 17

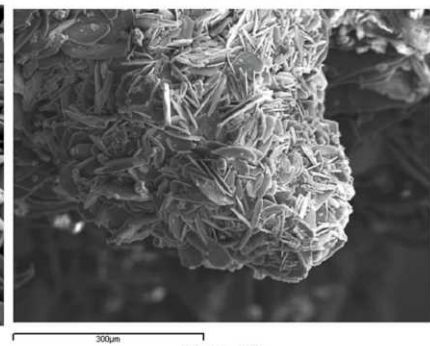


Figura 18

Figuras 13-18: 13-14. Espeleotemas cilíndricos de aspecto fungiforme cubiertos de maclas de yeso. Drömgrottan (Suecia). 15. Espeleotema cilíndrico de aspecto fungiforme. Gobholo (África). 16. Maclas de yeso en el extremo de espeleotemas cilíndricos. Drömgrottan (Suecia). 17. Maclas de yeso en el extremo de espeleotemas cilíndricos. Drömgrottan (Suecia). 18. Maclas de yeso en el extremo de espeleotemas cilíndricos. Ávila (España) (Fotografías 14, 16, 17 y 18 Vidal Romaní, J.R.).

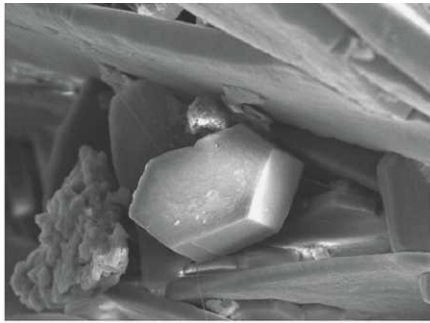


Figura 19

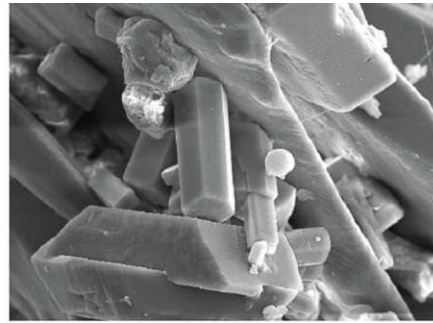


Figura 20



Figura 21



Figura 22



Figura 23



Figura 24

Figuras 19-24: 19-20. Cristales de anhidrita en la matriz del espeleotema. Ávila (España) (Vidal Romaní, J.R.). 21-22. Espeleotemas cilíndricos con punta blanquecina. (Argentina). 23. Espeleotemas cilíndricos. Castelo das Furnas (Portugal). 24. Espeleotemas cilíndricos de techo goteando. Cova dos Morcegos, O Pindo, Galicia (España) (Fotografías 19, 20 y 24 Vidal Romaní, J.R.).



Figura 25



Figura 26



Figura 27



Figura 28



Figura 29



Figura 30

Figuras 25-30: 25. Espeleotemas cilíndricos de suelo. Cavernas da Auga Corrente-Ilha Santa Catarina (Brazil) (Club espeleológico Pierre Martin). 26. Espeleotemas cilíndricos en césped. Castelo da Furna, Portugal (Vidal Romaní, J.R.). 27. Espeleotemas en césped. Cavernas da Auga Corrente-Ilha Santa Catarina (Brazil) (Club espeleológico Pierre Martin). 28. Espeleotemas cilíndricos en césped. Ézaro (Galicia, España). 29. Espeleotema planar (flowstone) de techo que oculta en ocasiones las microrugosidades de la roca y en otras zonas aún se aprecia la roca base. 30. Microgours en espeleotemas planares. Las Jaras (Córdoba, España).



Figura 31



Figura 32

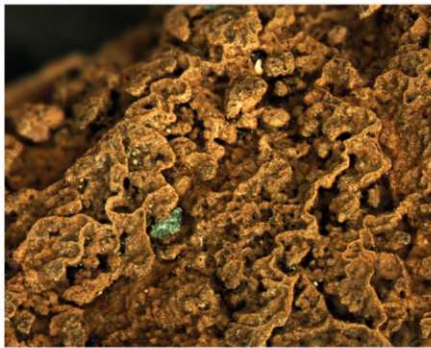


Figura 33



Figura 34



Figura 35

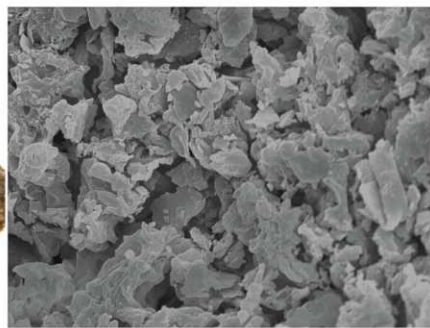


Figura 36

Figuras 31-36: 31. Espeleotemas planares blanquecinos. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 32. Aspecto superficial de espeleotemas planares. Fruberget (Suecia). 33. Microgours en espeleotemas planares. Las Jaras (Córdoba, España). 34. Bordes de microgours muy sinuosos en espeleotema planar de techo. Las Jaras, Córdoba, España. 35. Aspecto superficial de espeleotemas planares. Albarellos (Galicia, España). 36. Estructura de clastos cementada con ópalo A en espeleotemas. Peña del Hierro (Hueva, España).

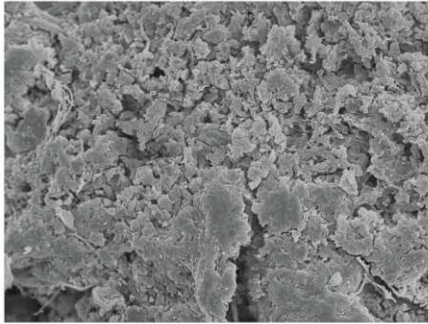


Figura 37



Figura 38

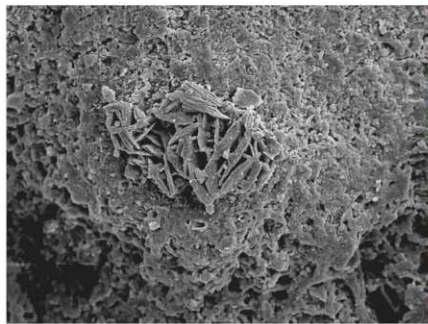


Figura 39



Figura 40

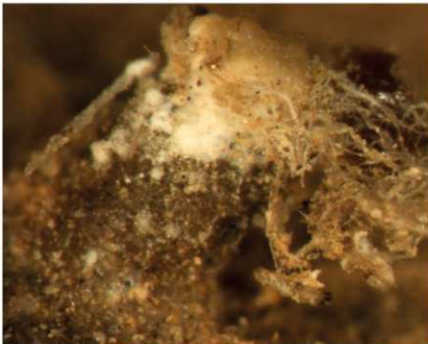


Figura 41

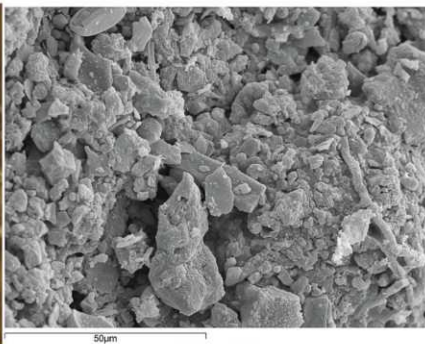


Figura 42

Figuras 37-42: 37. Estructura de clastos cementada con ópalo A en espeleotemas. Peña del Hierro (Hueva, España). 38. Maclas de yeso en bioespeleotemas. Anillaco, La Rioja, Argentina. (Vidal Romaní, J.R.). 39. Maclas de yeso en bioespeleotemas. Anillaco, La Rioja, Argentina. (Vidal Romaní, J.R.). 40. Espeleotema cilíndrico de base detritica y punta blanca debido a crecimiento de organismos. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 41. Espeleotema cilíndrico de base detritica y punta blanca debido a crecimiento de organismos. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 42. Textura detritica o matriz polimineral clastosa de los espeleotemas. Pampa de Achala, Argentina (Fotografías 37, 38, 39 y 42 Vidal Romaní, J.R.).



Figura 43

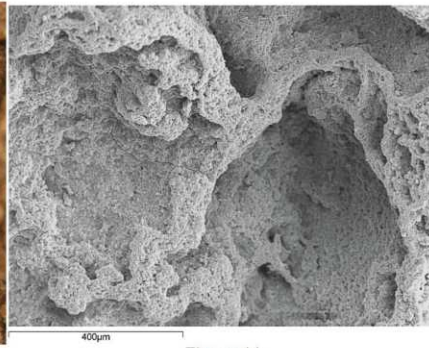


Figura 44



Figura 45

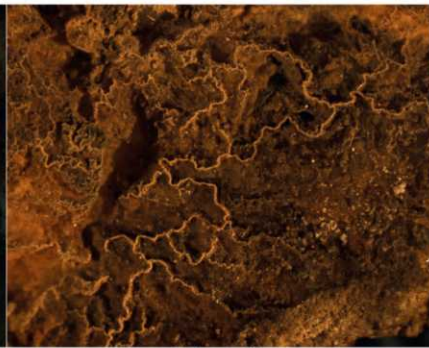


Figura 46



Figura 47



Figura 48

Figuras 43-48: 43. Acumulaciones de clastos producidos por la meteorización y arrastrados por el agua dejando surcos de la circulación del agua. 44. Oquedad dejada en la superficie de los espeleotemas por una gota de agua. Peña del Hierro (Hueva, España). 45. Espeleotemas planares y cilíndricos de borde. Gruta da Trilha do Saquinho. Brazil (Club Espeleológico Pierre Martín). 46. Finos microgours que recubren la superficie del espeleotema y dejan entrever la roca subyacente. Los Barruecos (Extremadura, España). 47. Microgours que recubren la superficie del espeleotema. Los Barruecos (Extremadura). 48. Finos microgours que recubren la superficie del espeleotema y dejan entrever la roca subyacente. Las Jaras (Córdoba, España). (Fotografía 44 Vidal Romani)



Figura 49

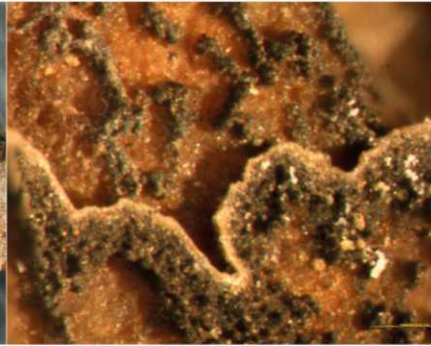


Figura 50

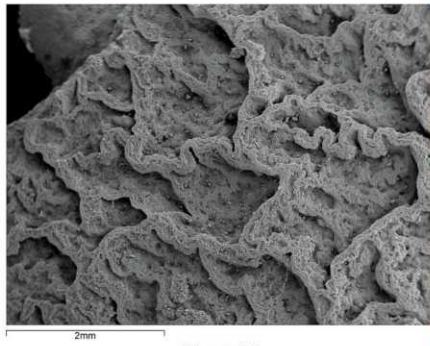


Figura 51



Figura 52

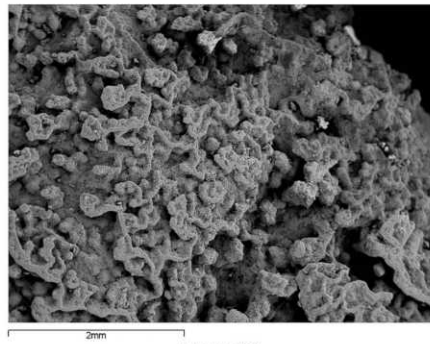


Figura 53

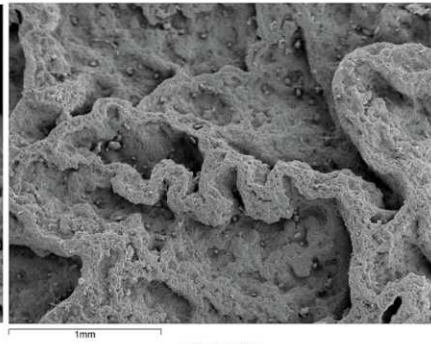


Figura 54

Figuras 49-54: 49. Ondulaciones dejadas por los granos que arrastraba la lámina de agua en la superficie del espeleotema. Peña del Hierro (Hueva, España). 50. Ondulaciones suspendidas dejadas por los granos que arrastraba en suspensión la lámina de agua en la superficie del espeleotema. Peña del Hierro (Hueva, España). 51. Sinuosidades de los microgours creados por el avance del agua sobre los espeleotemas. Peña del Hierro (Hueva, España). 52. Microgours que recubren la superficie del espeleotema. Las Jaras (Córdoba, España). 53. Microgours en espeleotemas planares. Las Jaras (Córdoba, España). 54. Sinuosidades de los microgours creados por el avance del agua sobre los espeleotemas. Peña del Hierro (Hueva, España). (Fotografía 51, 53 y 54 Vidal Romani)



Figura 55



Figura 56



Figura 57



Figura 58



Figura 59



Figura 60

Figuras 55-60: 55. Espeleotemas de pared con microgours. Furna Lameira- islas Ons (Galicia, España) (Club Aradelas, Vigo). 56. Espeleotemas de ópalo A planares (flowstone) de pared y de tipo estromatolito de pigotita superpuestos. Morcegos (Galicia, España). (Vidal Romani, J.R.). 57. Bordes de microgours muy sinuosos en espeleotema planar de techo. Las Jaras, Córdoba, España. 58. Espeleotemas planares tipo flowstone en techo. Ézaro (Galicia, España). 59. Espeleotemas planares tipo flowstone en techo. Ézaro (Galicia, España). 60. Microgours de suelo con un patrón regular en las líneas que los enmarcan, Furna das Pighosas, Pontevedra, Galicia, España (Vidal Romani, J.R.).



Figura 61

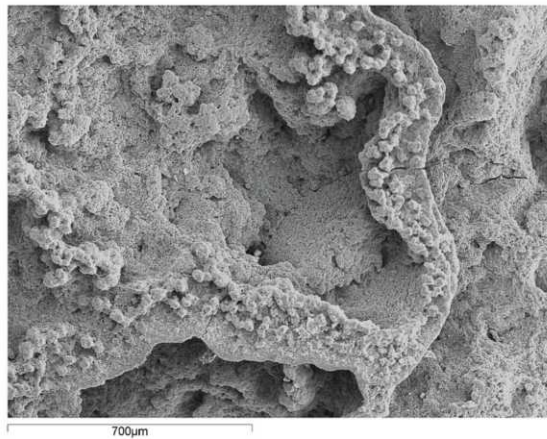


Figura 62

Figuras 61-62: 61. Estructuras foam like en la orilla del mar formando burbujas sobre la arena. 62. Bordes de microgours parecidos a las estructuras foam like que muestran un límite de la lámina de agua, Peña del Hierro, Huelva, España. (Fotografía 62 Vidal Romani)

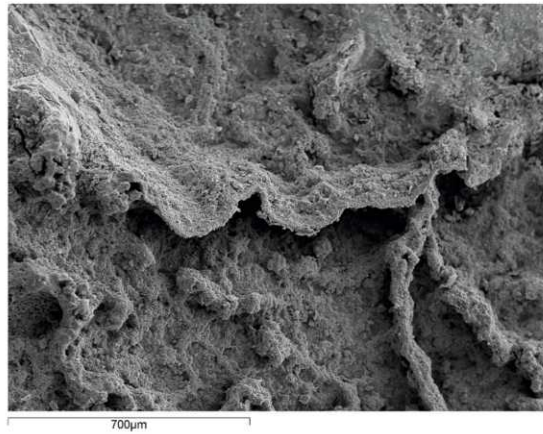


Figura 63

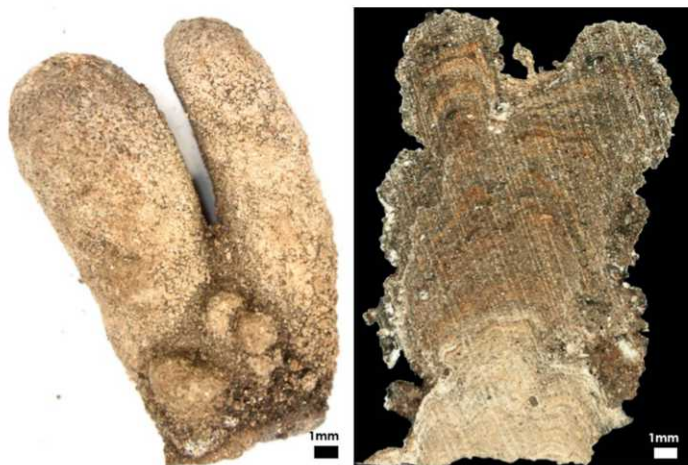


Figura 64

Figuras 63-64: 63. Sinuosidades de los microgours creados por el avance del agua sobre los espeleotemas. Peña del Hierro (Hueva, España). 64. Microstromatolitos terrestres con crecimiento en láminas superpuestas. A Trapa (Galicia, España). (Fotografía 63 Vidal Romani)

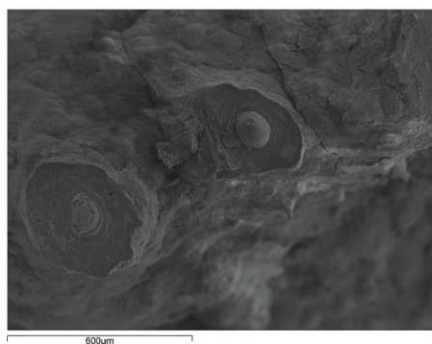


Figura 65

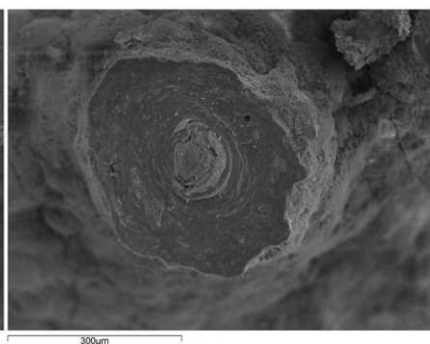


Figura 66

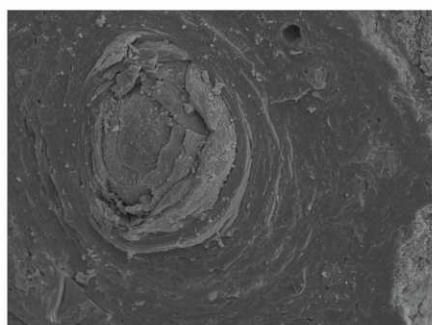


Figura 67

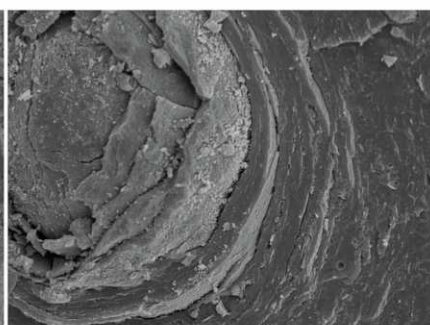


Figura 68

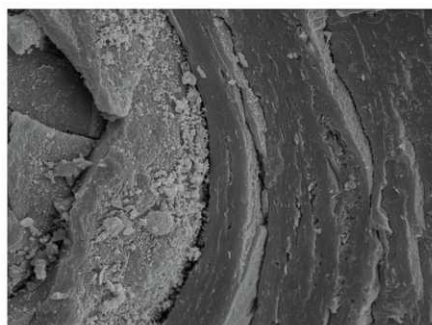


Figura 69

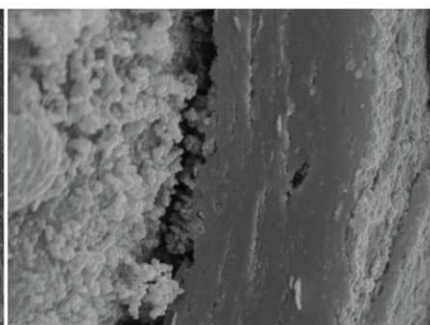


Figura 70

Figuras 65-70: 65. Corte transversal de los espeleotemas cilíndricos donde se observa su crecimiento en láminas concéntricas. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 66-70. Crecimiento del espeleotema en capas acrecionadas y organismos entre sus fases. Berrocal del Rugidero (Extremadura). (Fotografías Vidal Romani)

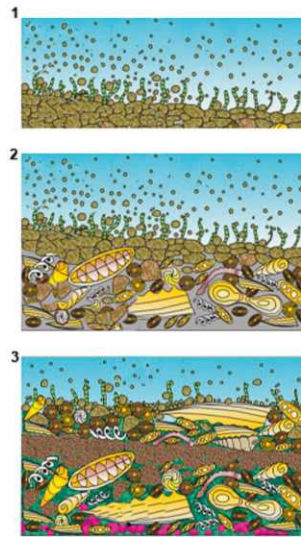


Figura 71

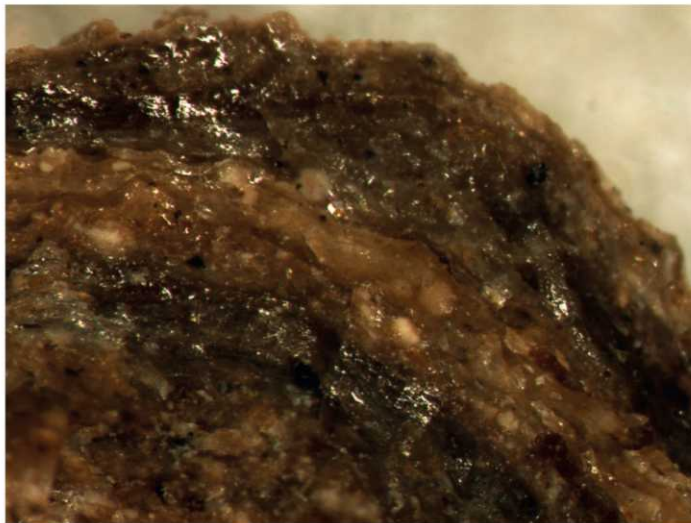


Figura 72

Figuras 71-72: 71. Dibujo esquemático de los procesos de acreción en capas de los espeleotemas de tipo microestromatolitos (Modificado de Jahnert & Collins, 2012). 72. Láminas claroscúras de crecimiento del espeleotema. Porteliña (Galicia, España).

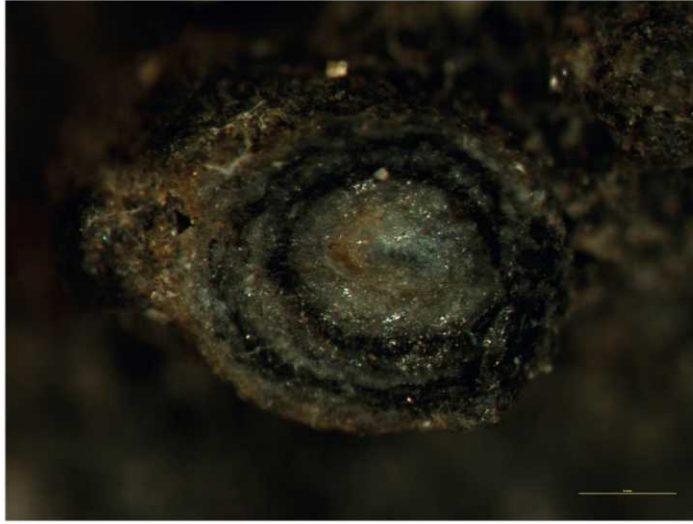


Figura 73

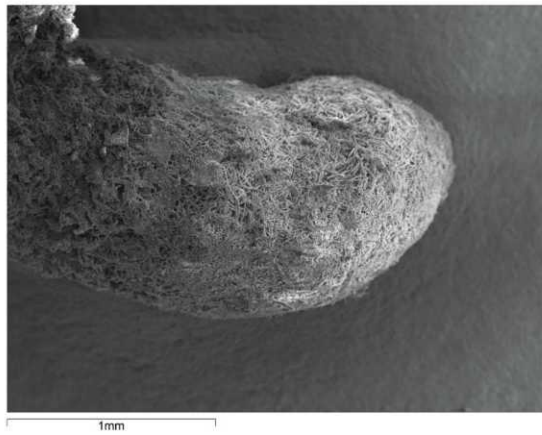


Figura 74

Figuras 73-74: 73. Crecimiento del espeleotema en láminas concéntricas. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 74. Transición de la parte más orgánica del espeleotema en la base al extremo donde crece la drusa con maclas de yeso. Castelo da Furna (Portugal). (Fotografía 74 Vidal Romani)

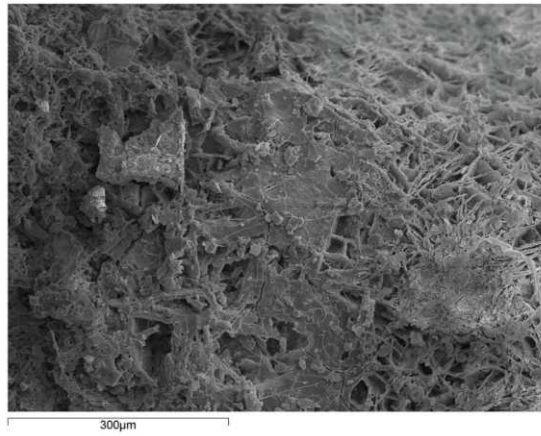


Figura 75



Figura 76

Figuras 75-76: 75. Drusa de maclas de yeso sepultada por ópalo A. Castelo da Furna (Portugal). 76. Imagen del ópalo A liso precipitando sobre la matriz detrítica. Drömgrottan (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)

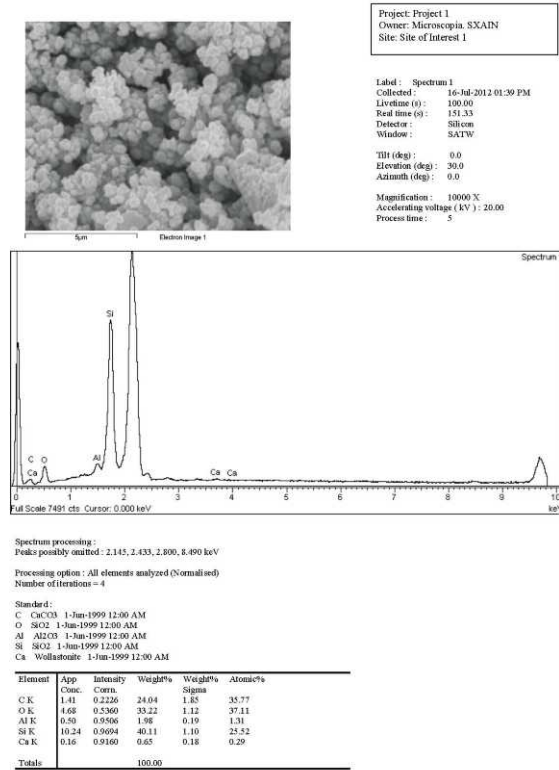


Figura 77



Figura 78

Figuras 77-78: 77. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB. El Si es el elemento dominante seguido del Al y el Ca esta posiblemente ligada a las plagioclasas debido al tipo de granitoide que constituye el sustrato rocoso de la zona. Sin embargo el C debe estar ligado a los microorganismos presentes en la muestra. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 78. Aspecto resinoso del hidrogel de silicio hidratado. Castelo da Furna (Portugal).

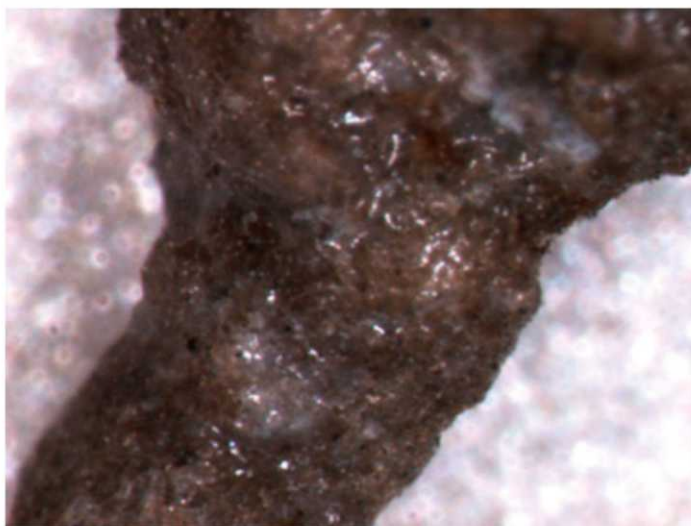
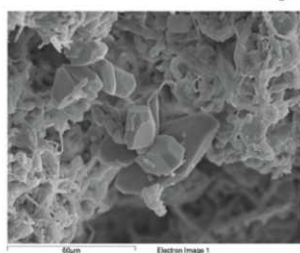


Figura 79



Element	App. Conc.	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
		Corr.		Sigma	
C K	0.08	0.4826	26.43	6.04	53.56
S K	0.07	1.0427	11.59	2.26	8.80
Ca K	0.39	1.0303	61.98	5.35	37.64
Totals			100.00		

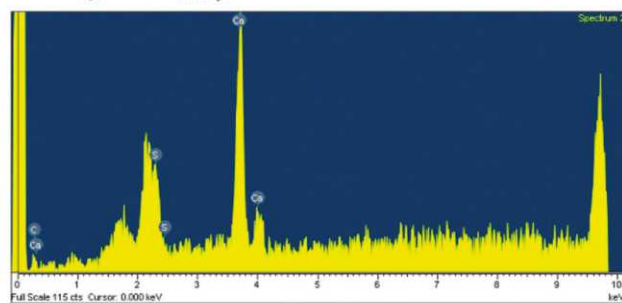


Figura 80

Figuras 79-80: 79. Aspecto resinoso del hidrogel de silicio hidratado. Hyden Rock (Australia). 80. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB Castelo da Fuma (Portugal).

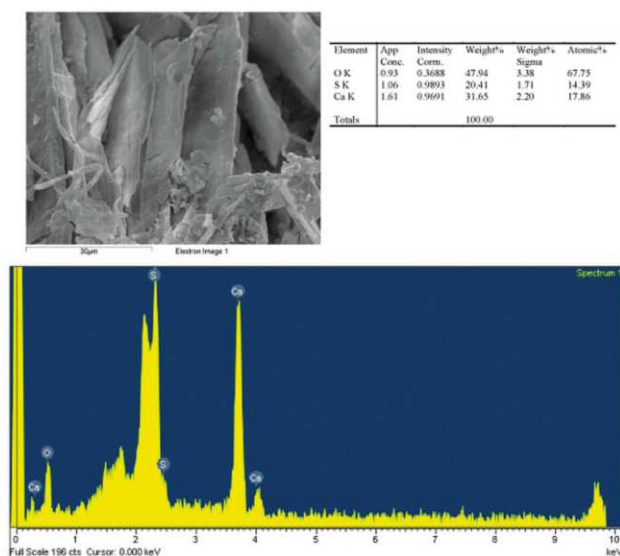


Figura 81

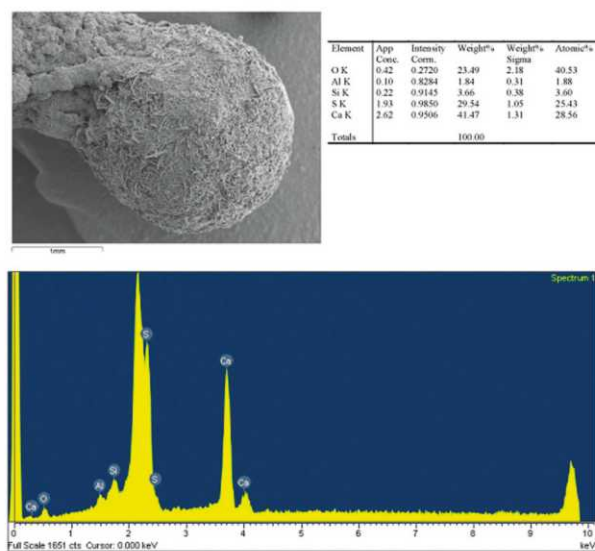


Figura 82

Figuras 81-82: 81. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB en drusas de yeso terminales. Castelo das Furnas (Portugal). 82. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB en la drusa de yeso terminal. Castelo da Furna (Portugal).

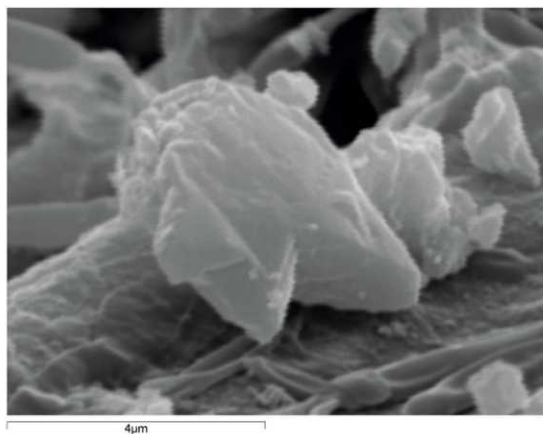


Figura 83

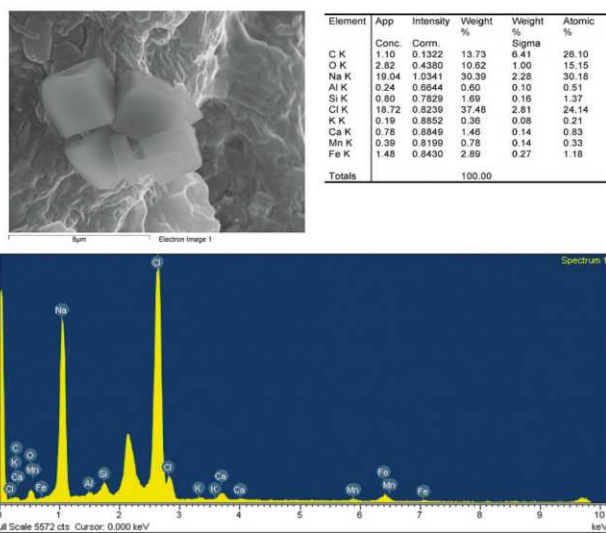


Figura 84

Figuras 83-84: 83. Macla de yeso en "punta de lanza". Drömgrottan (Suecia). 84. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB de un grupo de hexaedros de CaNa. Höllck Grottan (Suecia).

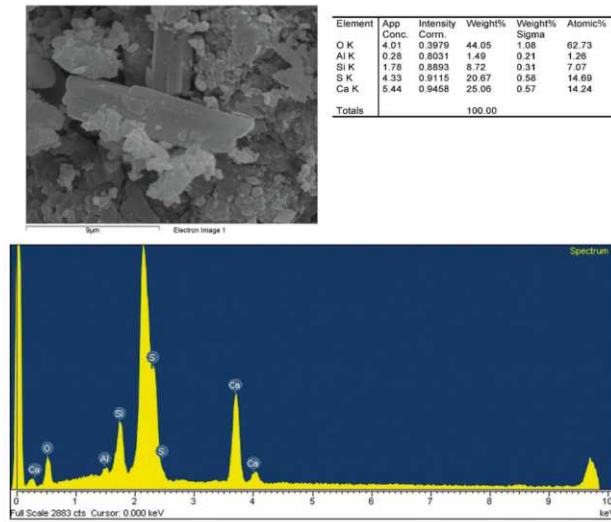


Figura 85

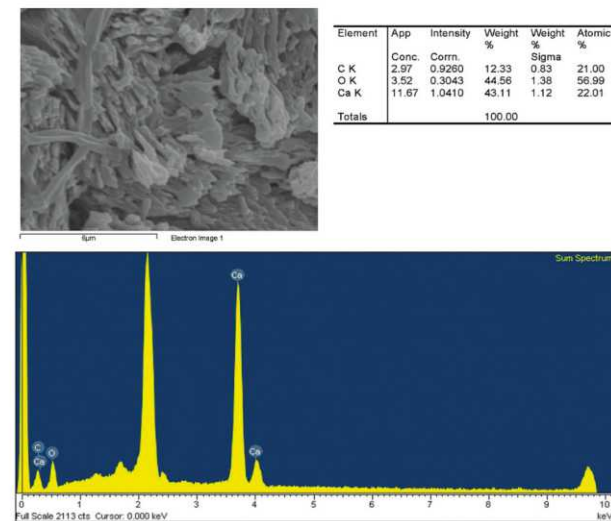


Figura 86

Figuras 85-86: 85. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB de cristales de calcita. 86. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB de cristales de calcita. Bodagrottor (Suecia).

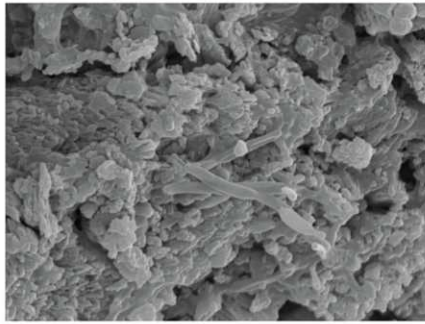


Figura 87

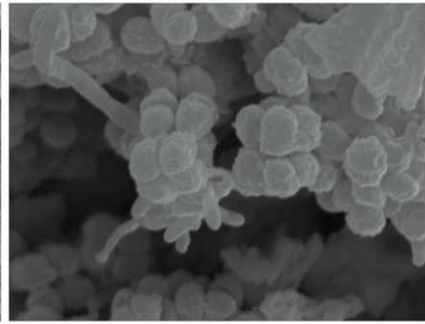


Figura 88

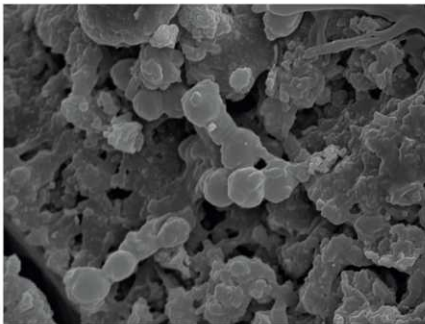


Figura 89

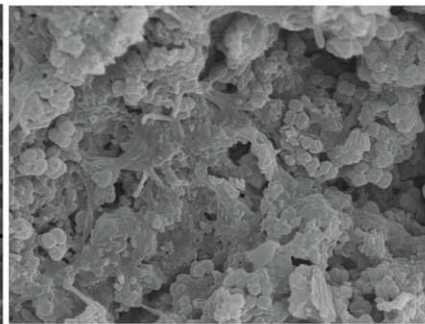


Figura 90

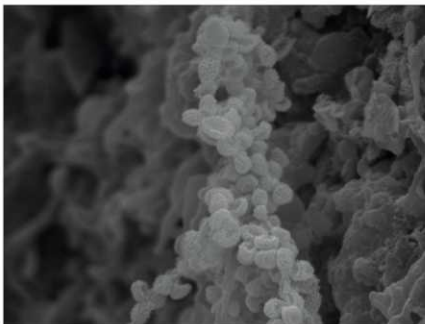


Figura 91

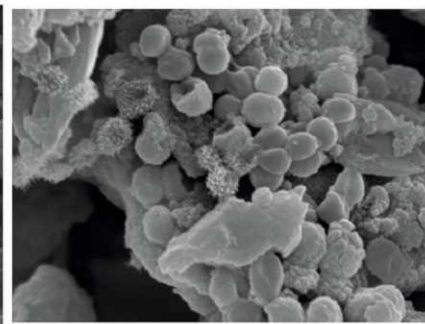


Figura 92

Figuras 87-92: 87. Cristales de calcita y sobre ellos crecimiento de bacterias filamentosas. Bodagrottor (Suecia). 88-92. Bacterias cocoides. (Fotografías Vidal Romani)

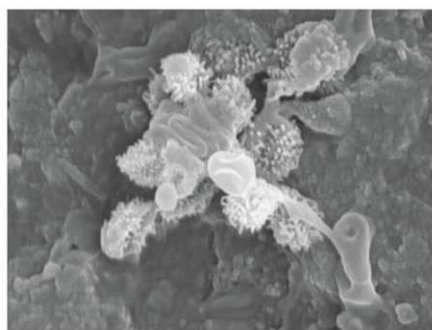


Figura 93

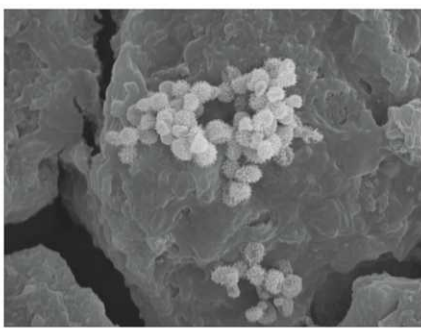


Figura 94

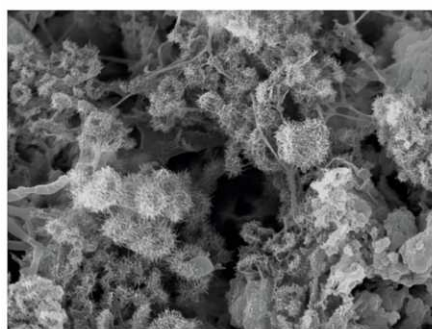


Figura 95

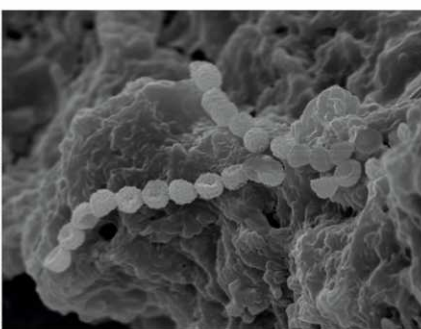


Figura 96



Figura 97

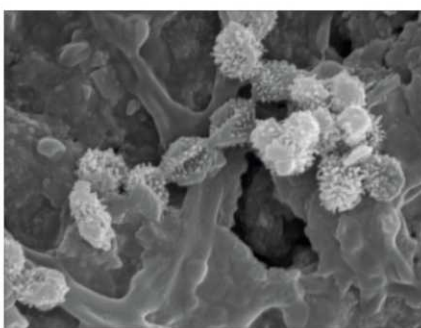


Figura 98

Figuras 93-98: 93. Bacterias cocoides. 94-98. Bacterias cocoides y estafilococos. (Fotografías Vidal Romani)

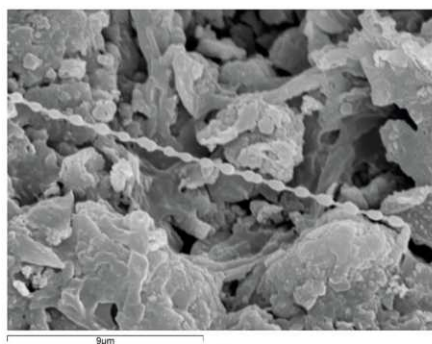


Figura 99

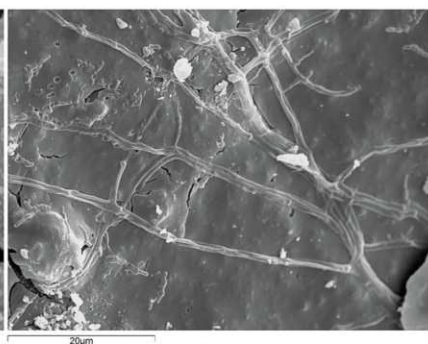


Figura 100

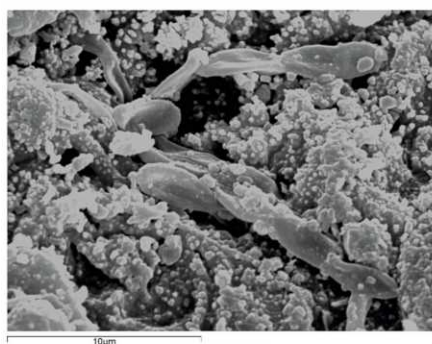


Figura 101

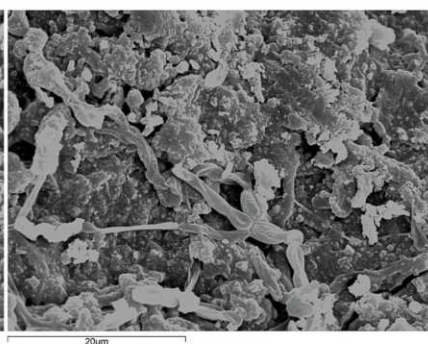


Figura 102

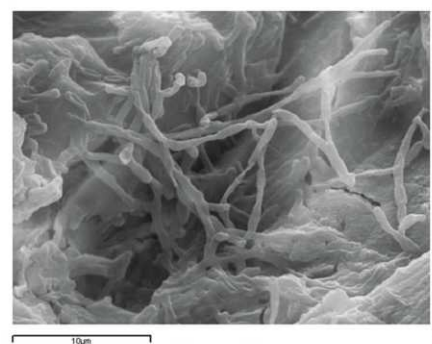


Figura 103

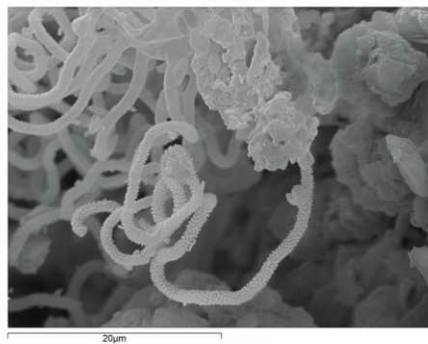


Figura 104

Figuras 99-104: 99. Bacterias cocoides y estafilococos. 100. Bacterias filamentosas, Gobholo (África). 101-102. Bacterias filamentosas, Austria. 103. Bacterias filamentosas. 104. Bacterias filamentosas. Las Jaras (Córdoba, España). (Fotografías Vidal Romani)

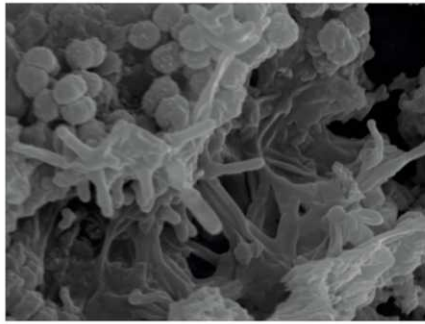


Figura 105

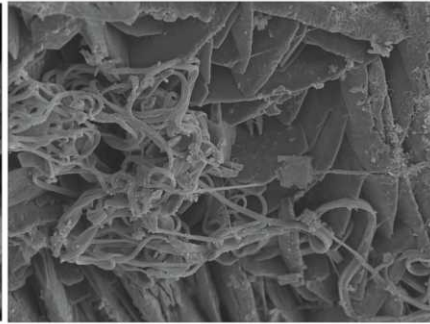


Figura 106

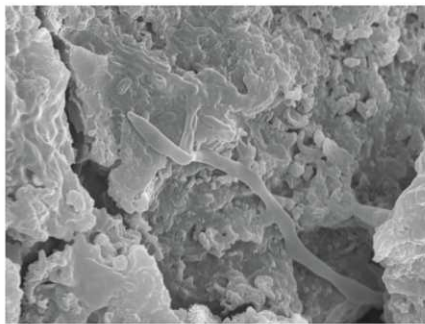


Figura 107

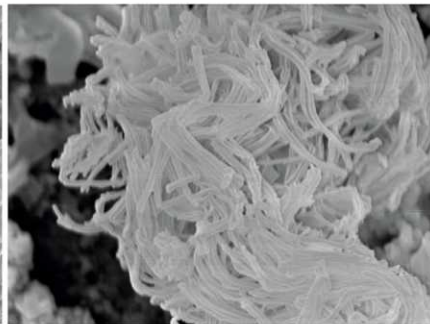


Figura 108

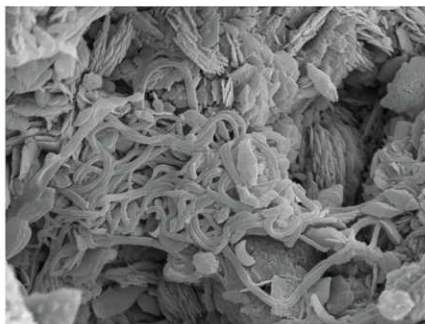


Figura 109

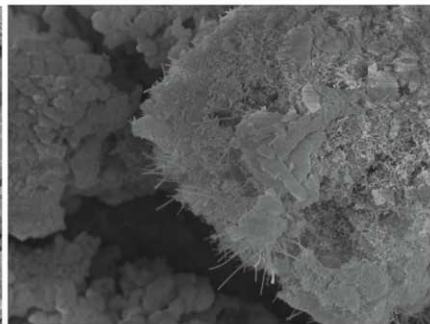


Figura 110

Figuras 105-110: 105-109. Bacterias filamentosas. 106. Bacterias filamentosas. Kvarnberget (Suecia). 110. Bacterias filamentosas. Kvarnberget (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)

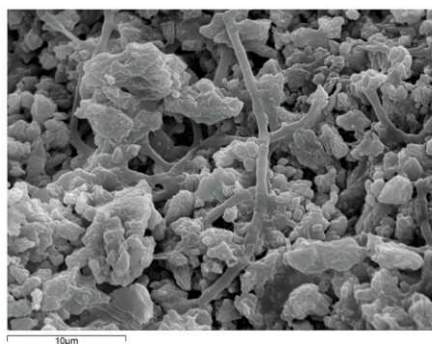


Figura 111

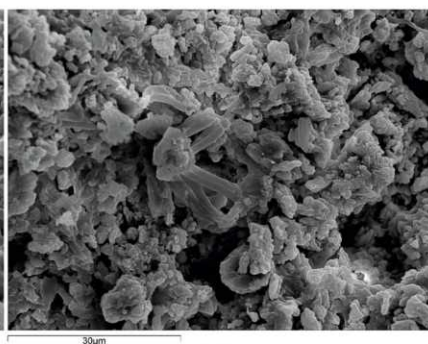


Figura 112

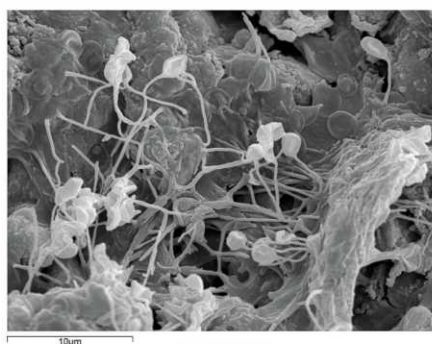


Figura 113

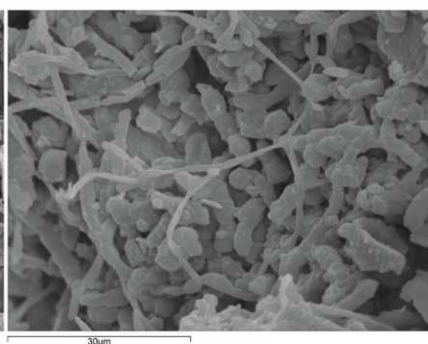


Figura 114

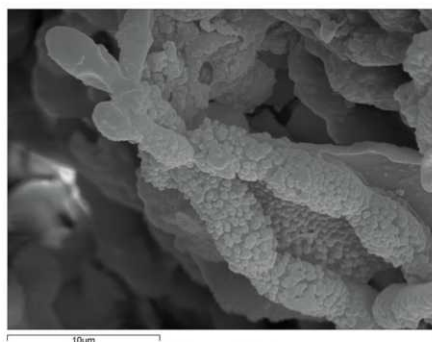


Figura 115

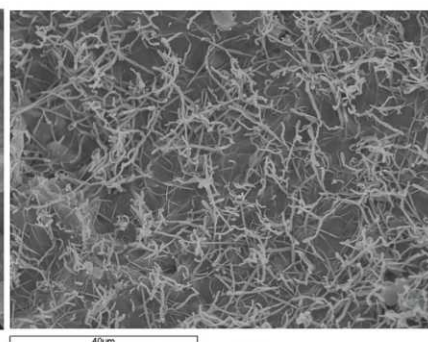


Figura 116

Figuras 111-116: 111-112. Bacterias filamentosas. Trollhålet (Suecia). 113-115. Bacterias filamentosas. Castelo da Furna (Portugal). 116. Bacterias filamentosas.. (Fotografías Vidal Romani)

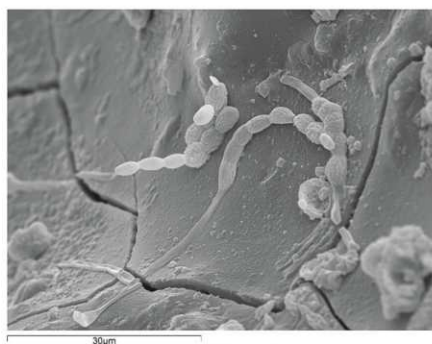


Figura 117

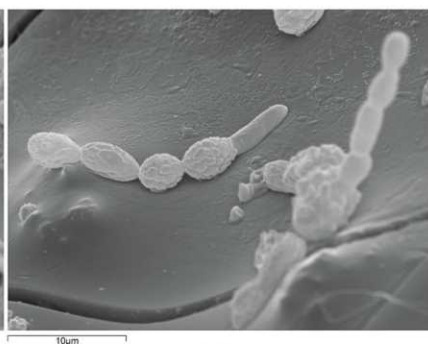


Figura 118

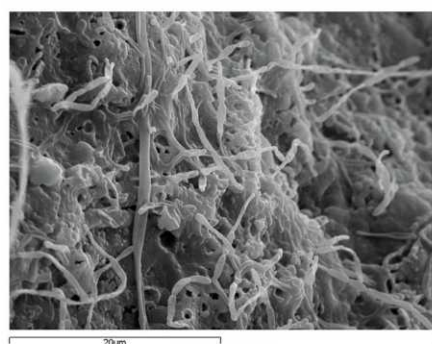


Figura 119

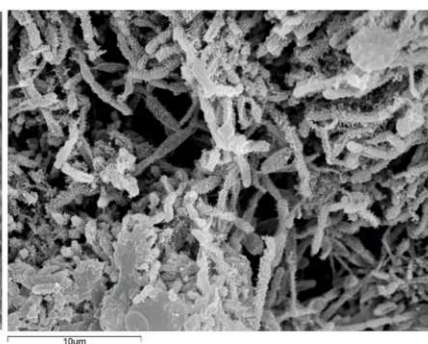


Figura 120

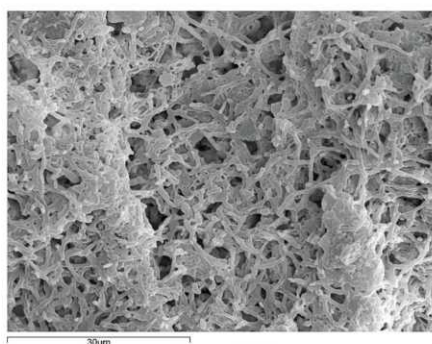


Figura 121

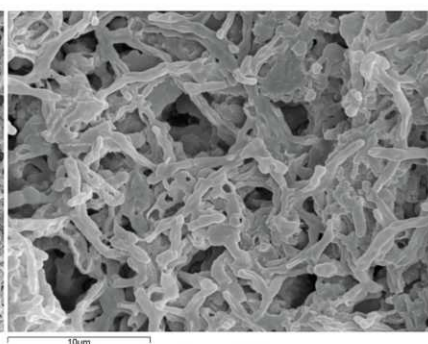


Figura 122

Figuras 117-122: 117-118. Bacterias filamentosas. Gundaring (Australia). 119. Bacterias filamentosas. 120. Bacterias filamentosas Porteliña (Galicia, España). 121-122. Bacterias filamentosas. A Cunchosa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

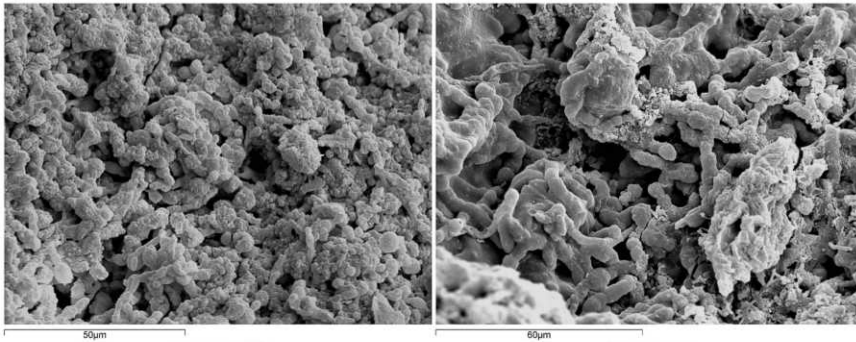


Figura 123

Figura 124

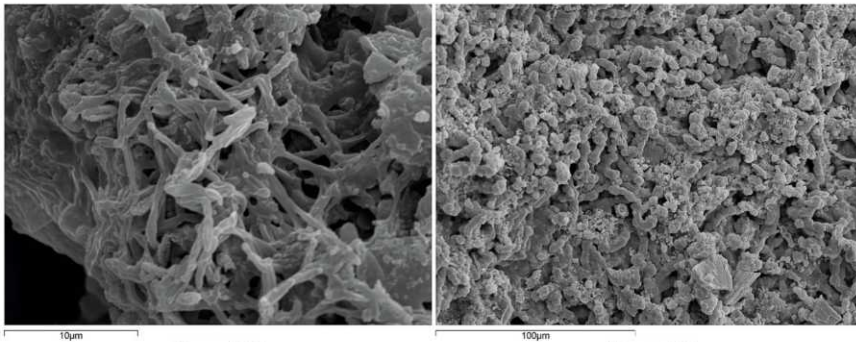


Figura 125

Figura 126

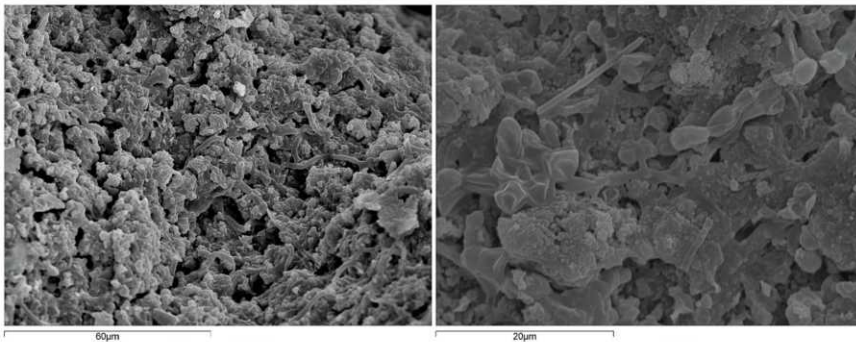


Figura 127

Figura 128

Figuras 123-128: 123. Bacterias filamentosas. Morcegos (Galicia, España). 124. Bacterias filamentosas. Castelo da Furna (Portugal). 125. Bacterias filamentosas. Pukeberg (Suecia). 126-127. Bacterias filamentosas. Castelo da Furna (Portugal). 127. Bacterias filamentosas. Fruberget (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)

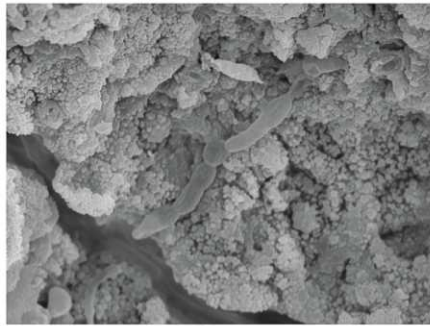


Figura 129

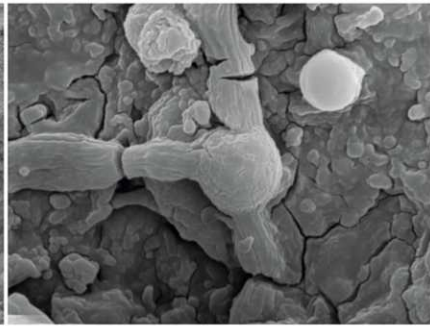


Figura 130

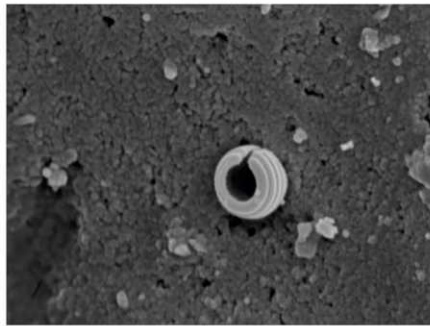


Figura 131

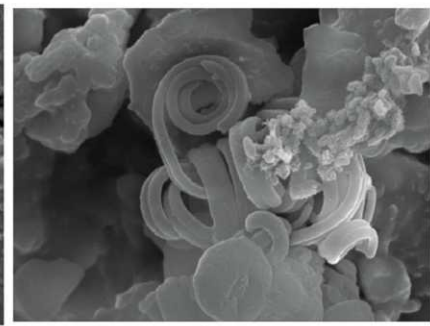


Figura 132

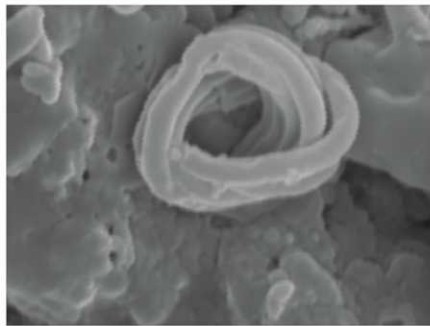


Figura 133

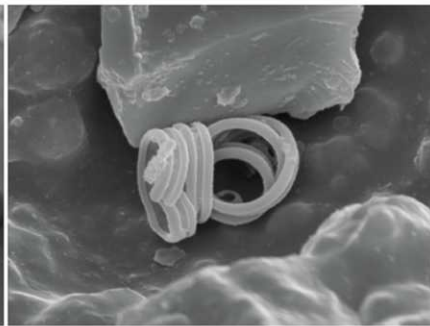


Figura 134

Figuras 129-134: 129. Bacterias filamentosas. Fruberget (Suecia). 130. Bacterias filamentosas. Töro (Suecia). 131. Espirilos, Gundaring (Australia). 132. Espirilos. 133. Espirilos, Alto de Barruecos (Extremadura, España). 134. Espirilos, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). (Fotografías Vidal Romani)

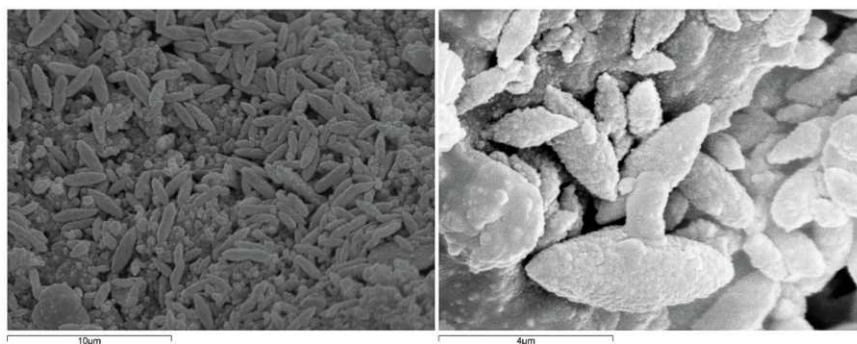


Figura 135

Figura 136

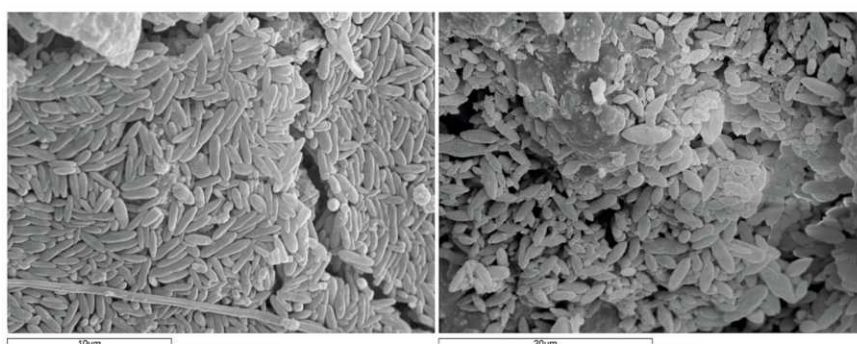


Figura 137

Figura 138

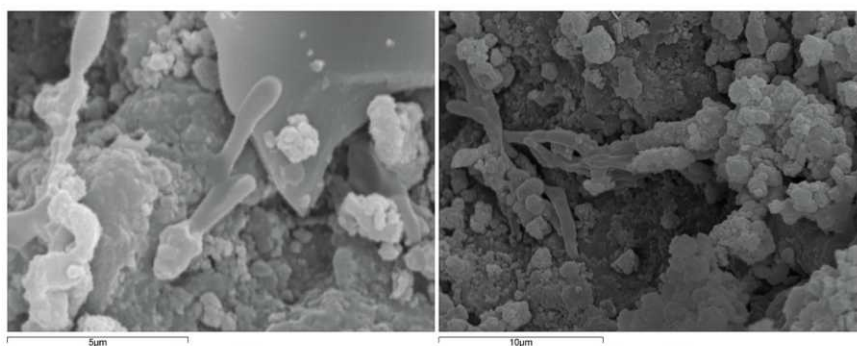


Figura 139

Figura 140

Figuras 135-140: 135-136, 138. Bacterias fusiformes, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 137. Bacterias fusiformes, Gundaring (Australia). 139. Espora germinando, Kvarnberget (Suecia). 140. Esporas germinando. Kvarnberget (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)



Figura 141

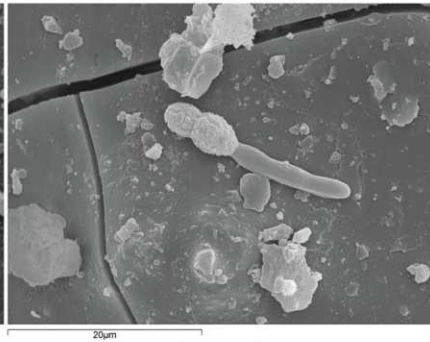


Figura 142

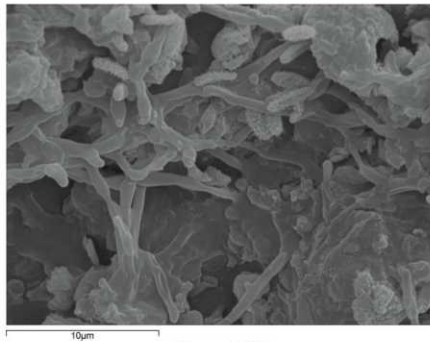


Figura 143

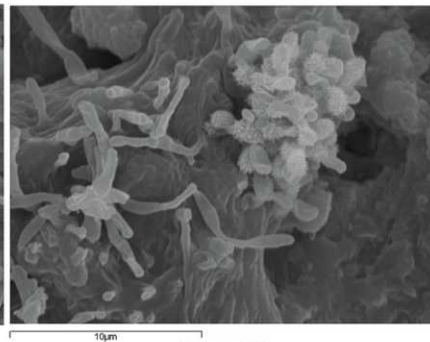


Figura 144

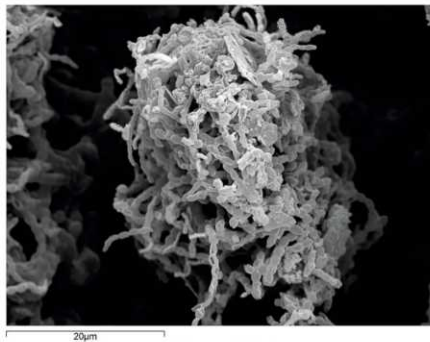


Figura 145

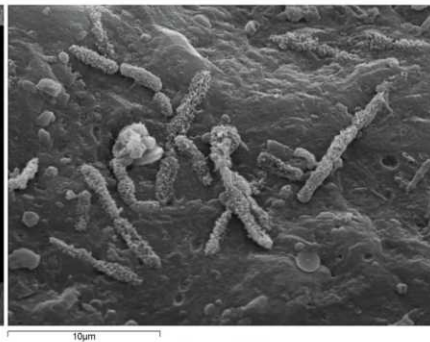


Figura 146

Figuras 141-146: 141. Esporas germinando. Gundaring (Australia). 142. Esporas germinando. 143. Esporas germinando. Pukeberg (Suecia). 144. Esporas germinando. 145. Esporas germinando. A Trapa (Galicia, España). 146. Esporas germinando. A Trapa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

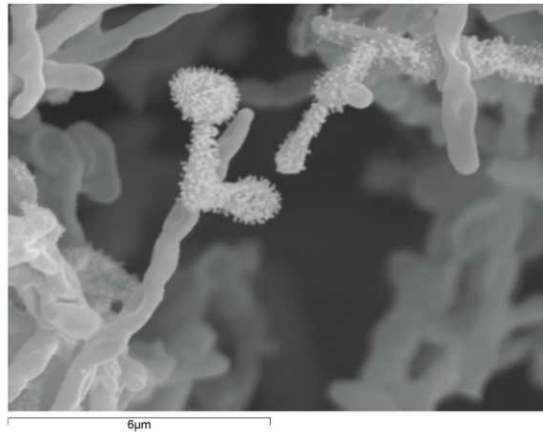


Figura 147

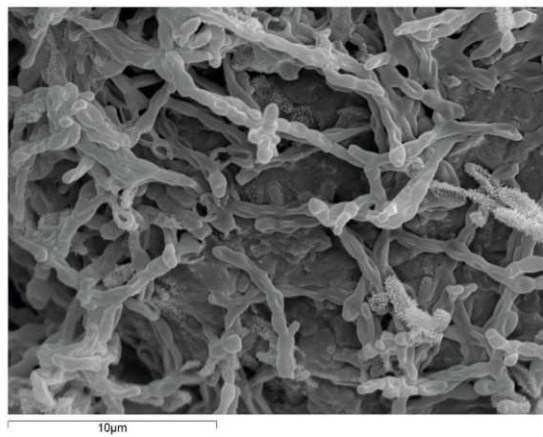


Figura 148

Figuras 147-148: Esporas germinando. A Trapa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

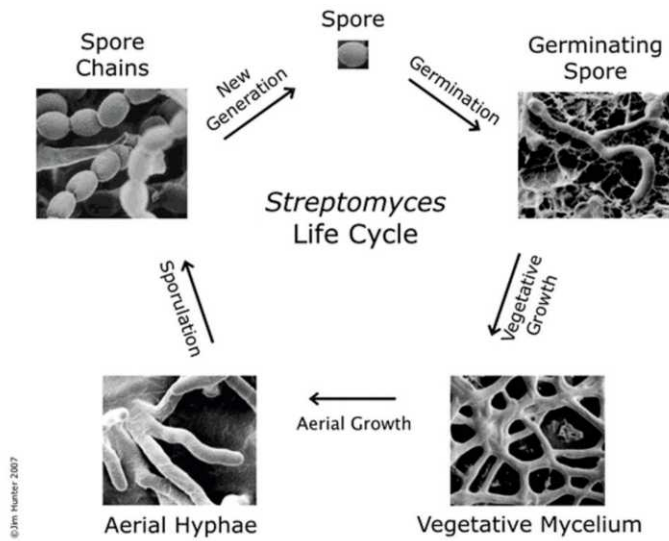


Figura 149

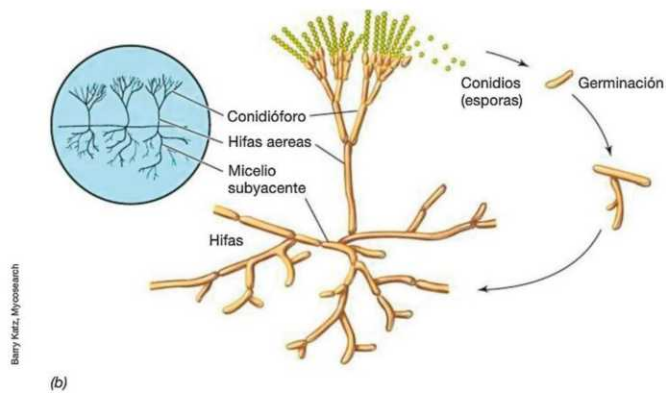


Figura 150

Figuras 149-150: 149. Ciclo de vida de *Streptomyces* (Hunter, 2007). 150. Estructuras reproductoras de Hongos (Madigan et al., 2009).

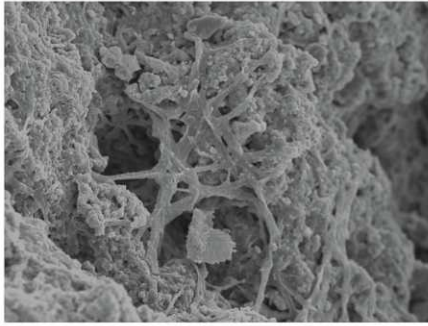


Figura 151

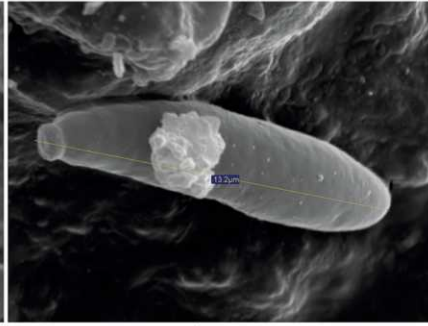


Figura 152

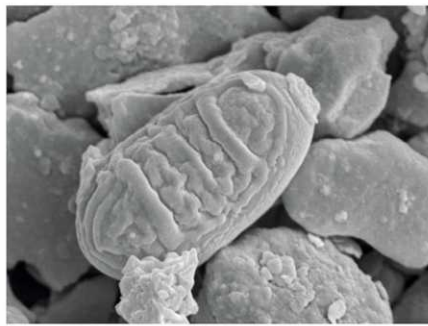


Figura 153

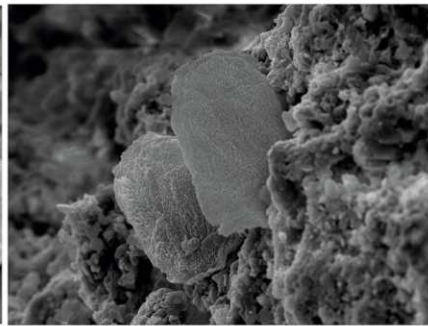
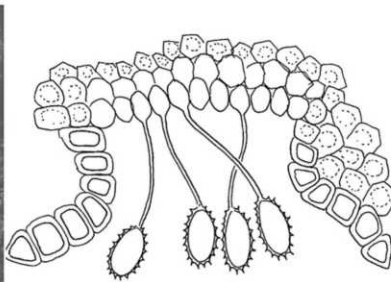


Figura 154



Figura 155



Puccinia: uredio con uredósporas

Figura 156

Figuras 151-156: 151. Hifas de hongos, Peña del Hierro (Hueva, España). 152. Esporas de hongos, Hyden Rock (Australia). 153. Esporas de hongos, Argentiina. 154. Esporas de hongos, Trollhålet (Suecia). 155. Esporas de hongos, Gundaring (Australia). 156. Esporas de hongos, uredósporas. (Fotografías Vidal Romani).

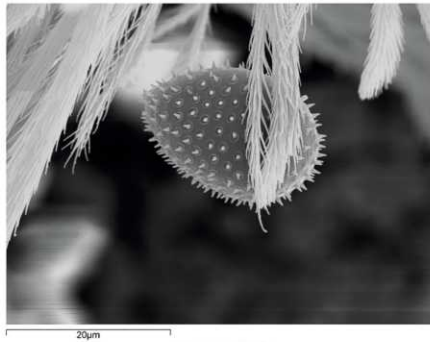


Figura 157

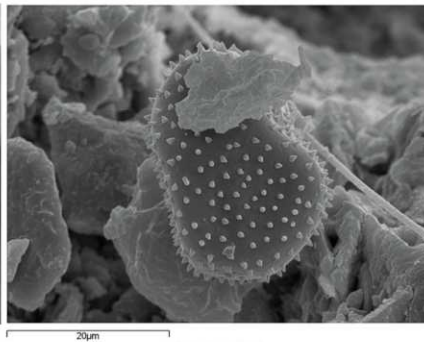


Figura 158

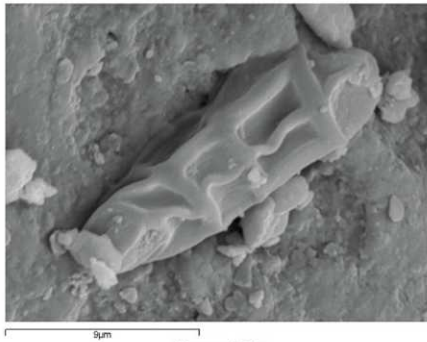


Figura 159

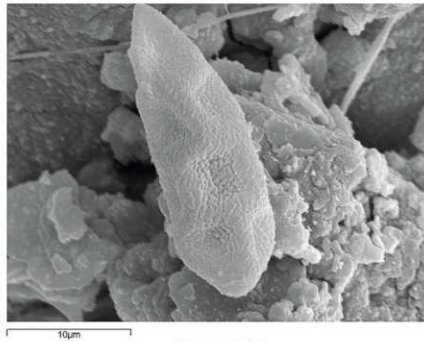


Figura 160



Figura 161

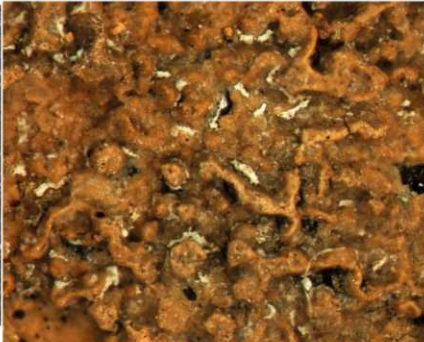


Figura 162

Figuras 157-162: 157. Esporas de hongos, uredósporas, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 158. Esporas de hongos, uredósporas, Los Riojanos (Argentina). 159. Esporas de hongos, uredósporas, Argentina. 160. Esporas de hongos, uredósporas, Pampa de Achala (Argentina). 161. Esporas de hongos, uredósporas, Gundaring (Australia). 162. Restos biológicos de hongos. (Fotografías Vidal Romani)



Figura 163

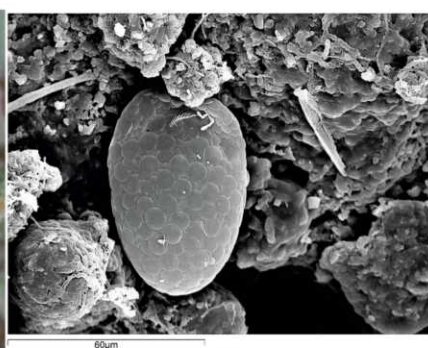


Figura 164

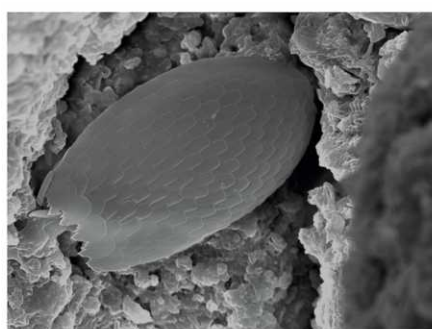


Figura 165

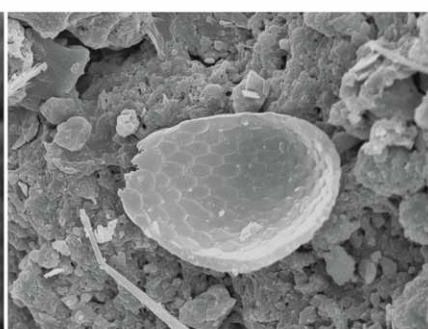


Figura 166

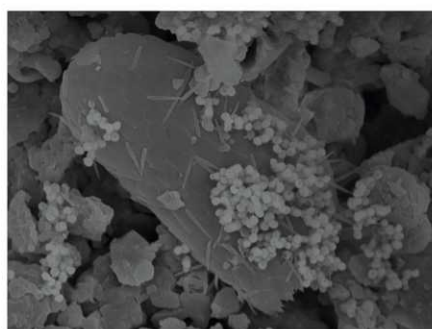


Figura 167

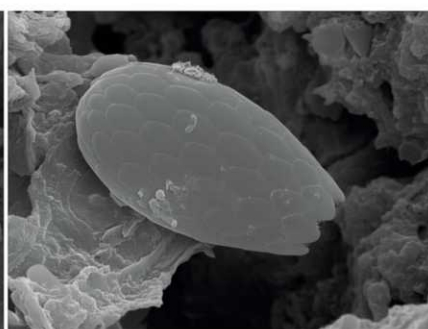


Figura 168

Figuras 163-168: 163. Esporas de hongos vistas al microscopio estereoscópico Campofrío (Hueva, España). 164. Quiste de ameba testácea con tapón en el pseudostoma, A Trapa (Galicia, España). 165. *Euglypha rotunda*, Castelo da Furna (Portugal). 166. *Euglypha rotunda* var. *minor*, Peña del Hierro (Hueva, España). 167. *Euglypha strigosa*, Gundaring (Australia). 168. *Euglypha hialina*, Porteliña (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

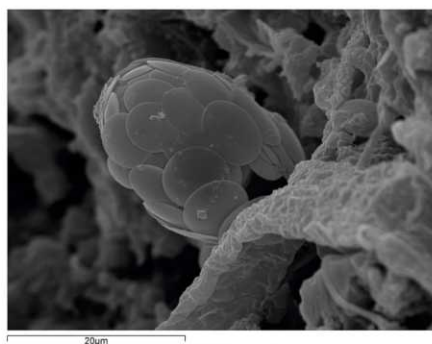


Figura 169

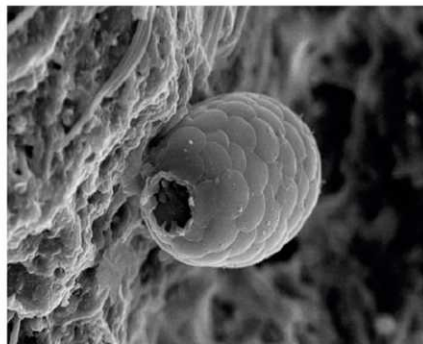


Figura 170

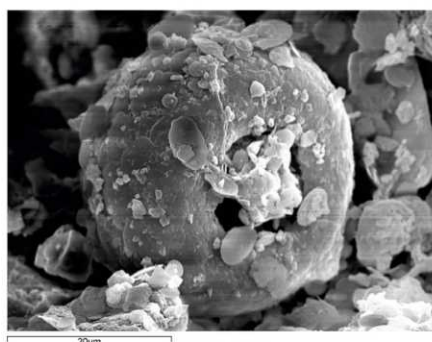


Figura 171

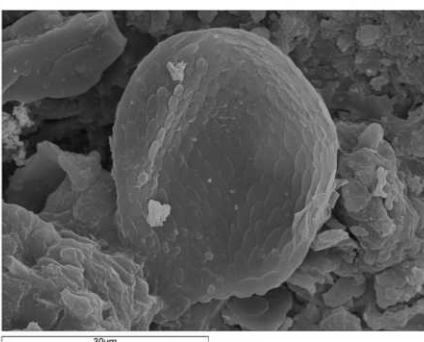


Figura 172



Figura 173

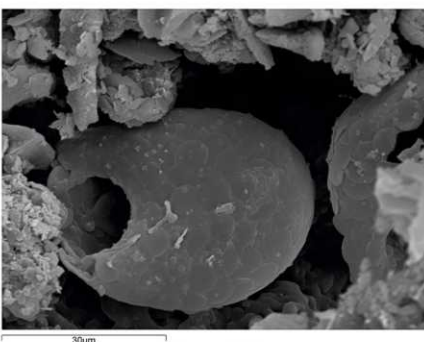


Figura 174

Figuras 169-174: 169. *Sphenoderia lenta*, Porteliña (Galicia, España). 170. *Tracheleuglypha dentata*, Ávila (España). 171. *Tracheleuglypha acolla*, A Trapa (Galicia, España). 172. *Assulina muscorum*, Peña del Hierro (Hueva, España). 173. *Trinema complanatum*, Porteliña (Galicia, España). 174. *Trinema enchelys*, A Trapa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

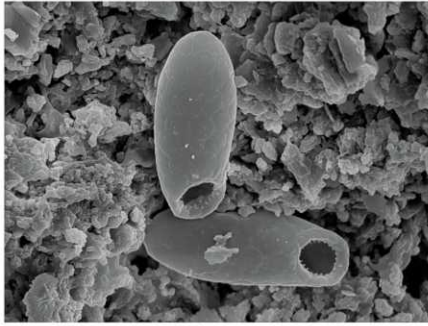


Figura 175

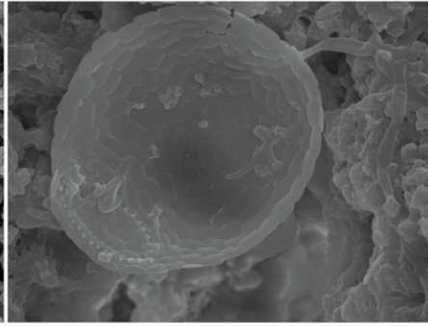


Figura 176

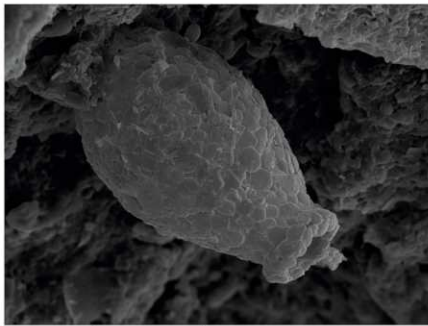


Figura 177

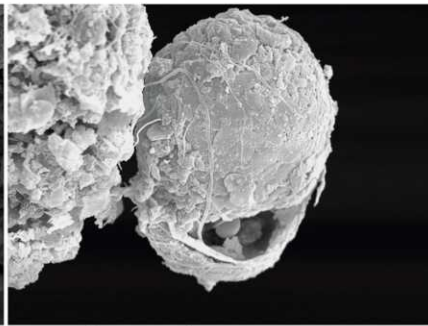


Figura 178

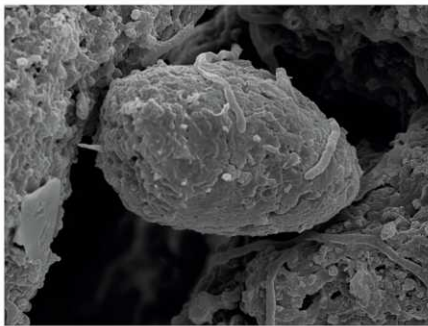


Figura 179

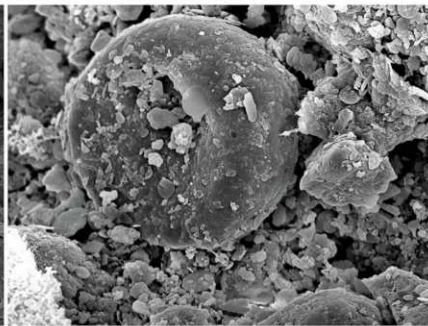


Figura 180

Figuras 175-180: 175. *Trinema lineare*, Trollhålet (Suecia). 176. *Corythion dubium*, Castelo da Furna (Portugal). 177. *Physochila (Nebela) griseola*, Porteliña (Galicia, España). 178. *Centropyxis aerophila*, Murphy's Haystacks (Australia). 179. *Pseudodiffugia virescens*, Castelo da Furna (Portugal). 180. *Plagiopyxis declivis*, A Trapa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

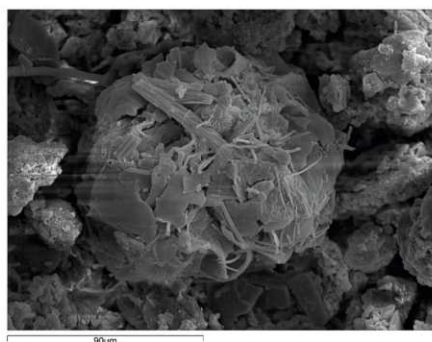


Figura 181

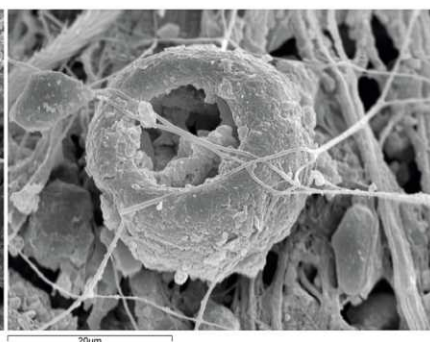


Figura 182

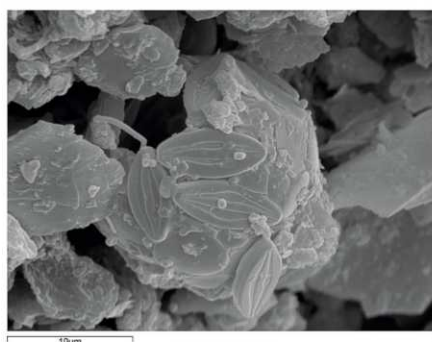


Figura 183

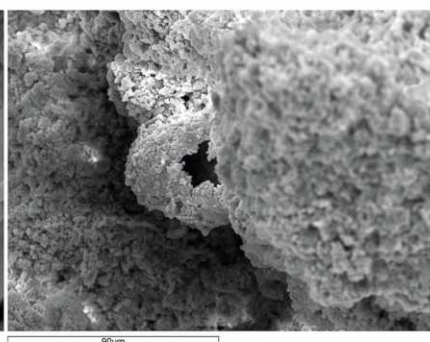


Figura 184

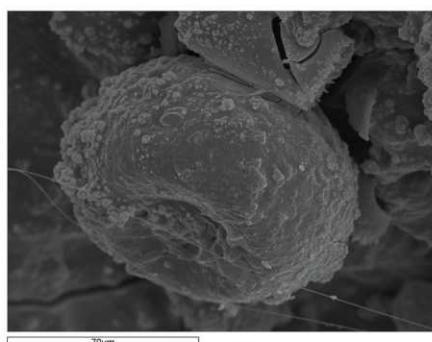


Figura 185

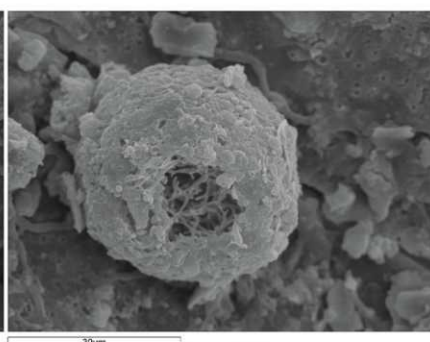


Figura 186

Figuras 181-187: 181. *Amphitrema wrightianum*, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 182. *Phryganella acropodia*, Murphy's Haystacks (Australia). 183. *Diffugia minutissima*, Albarellos (Galicia, España). 184. *Diffugia gramen*, Trollhället (Suecia). 185. *Cyclopyxis kahli*, Albarellos (Galicia, España). 186. *Cyclopyxis eurystoma*, Castelo da Furna (Portugal). (Fotografías Vidal Romani)



Figura 187

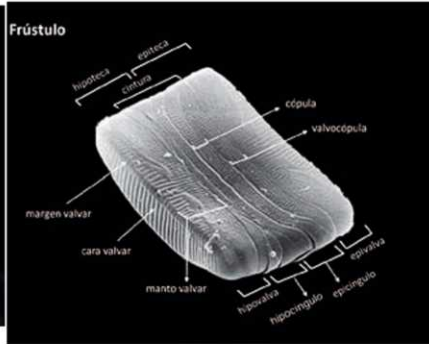


Figura 188

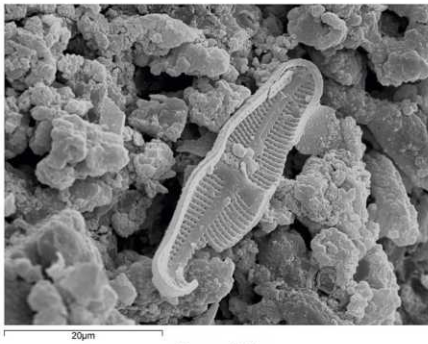


Figura 189

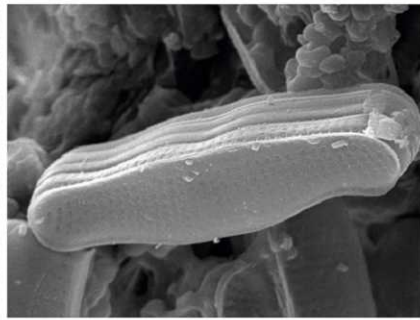


Figura 190

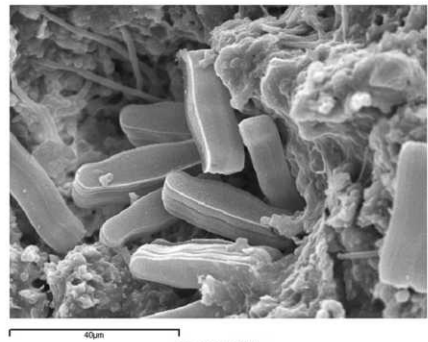


Figura 191

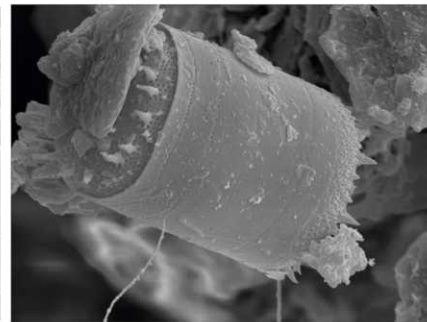


Figura 192

Figuras 187-192: 187. *Cryptodiffugia oviformis*, Castelo da Furna (Portugal). 188. Estructura del frústulo de una diatomea. 189. *Achnanthes* sp., Castelo da Furna (Portugal). 190. *Achnanthes* sp., Ávila (España). 191. *Achnanthes* sp., Ávila (España). 192. *Aulacoseira* sp., Pampa de Achala (Argentina). (Fotografías Vidal Romani)

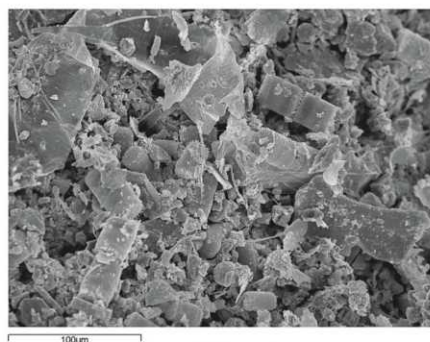


Figura 193



Figura 194

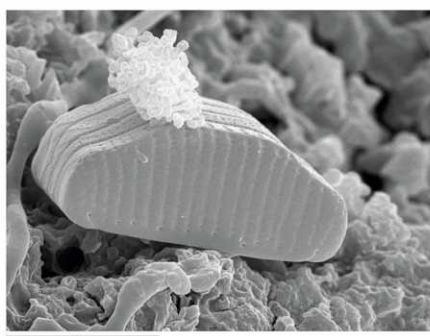


Figura 195

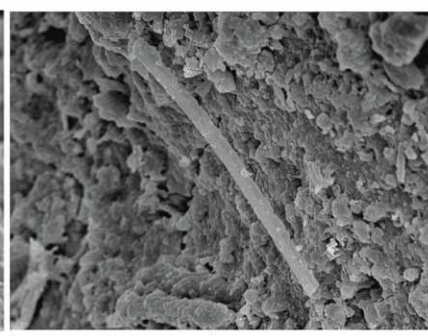


Figura 196

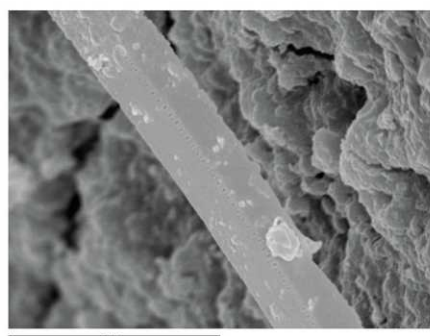


Figura 197

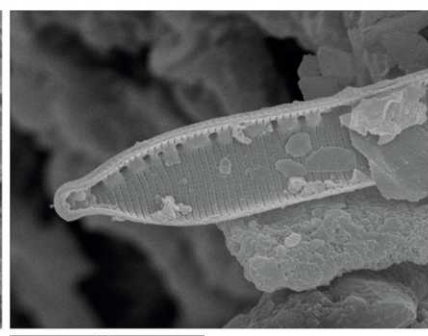


Figura 198

Figuras 193-198: 193. *Aulacoseira* sp., Pampa de Achala (Argentina). 194. *Eunotia* sp., Gundaring (Australia). 195. *Eunotia* sp., Castelo da Furna (Portugal). 196. *Fragilaria* sp., Los Riojanos (Argentina). 197. *Fragilaria* sp., Los Riojanos (Argentina). 198. *Hantzchia* sp., Pampa de Achala (Argentina). (Fotografías Vidal Romani)

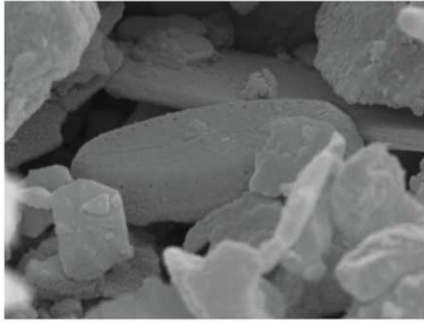


Figura 199

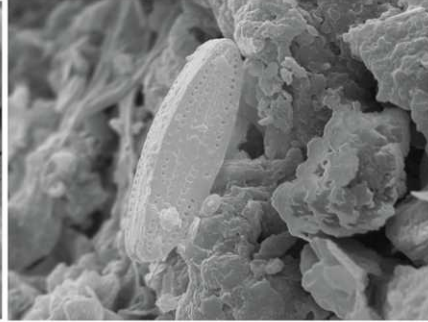


Figura 200

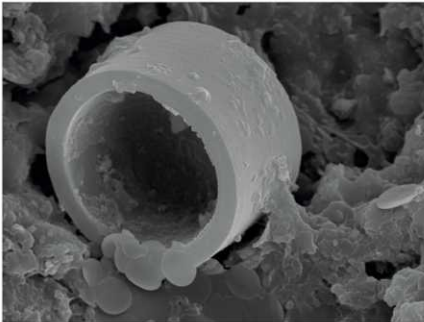


Figura 201

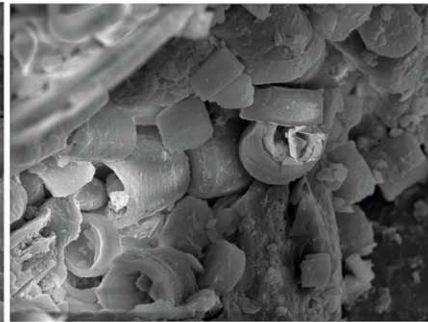


Figura 202

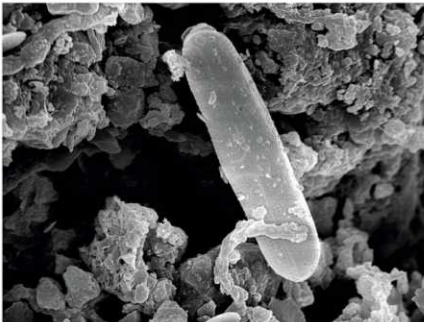


Figura 203

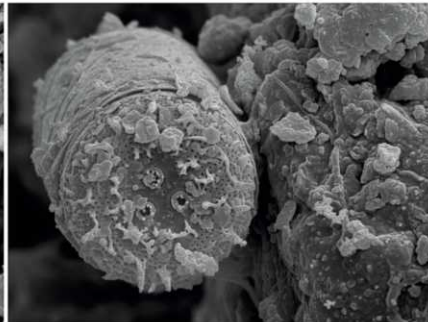


Figura 204

Figuras 199-204: 199. *Lemnicola* sp., Vereda de San Martín (Argentina). 200. *Luticola* sp., Las Jaras (Córdoba, España). 201. *Melosira* sp., Porteliña (Galicia, España). 202. *Melosira* sp., Pampa de Achala (Argentina). 203. *Muelleria* sp. Gobholo (África). 204. *Orthoseira* sp., Murphy's Haystacks (Australia). (Fotografías Vidal Romani)

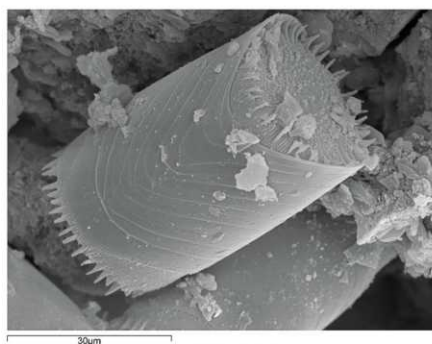


Figura 205

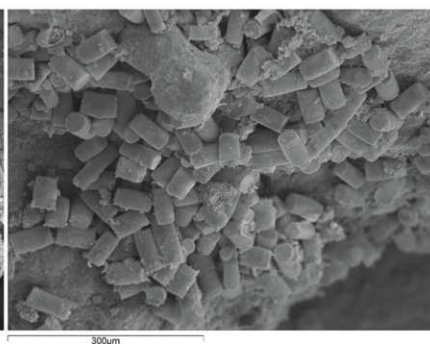


Figura 206

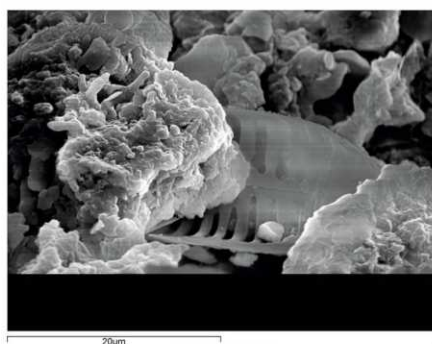


Figura 207

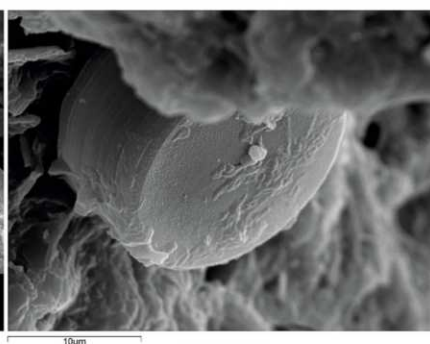


Figura 208

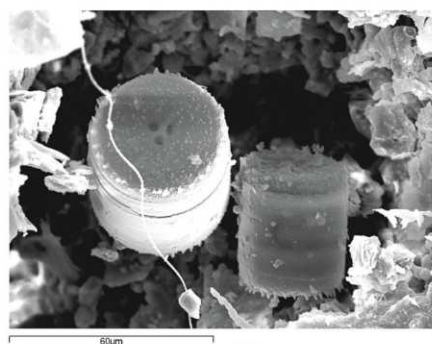


Figura 209

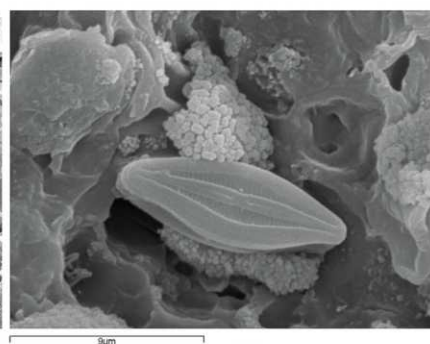


Figura 210

Figuras 205-210: 205. *Orthoseira* sp., Albarellos (Galicia, España). 206. *Orthoseira* sp., Albarellos (Galicia, España). 207. *Punctastriata* sp., Castelo da Furna (Portugal). 208. *Spicaticribra* sp., Porteliña (Galicia, España). 209. *Stephanodiscus* sp., Pampa de Achala (Argentina). 210. Diatomea, Louro (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

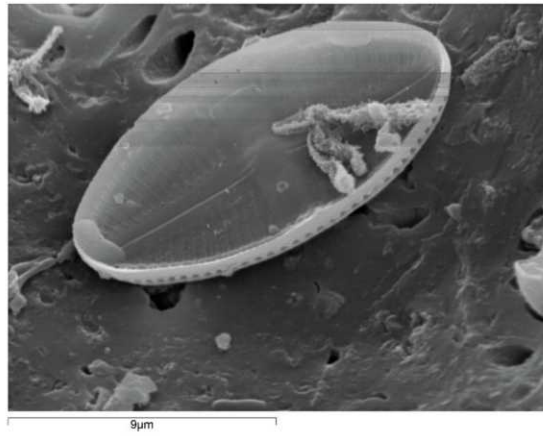


Figura 211

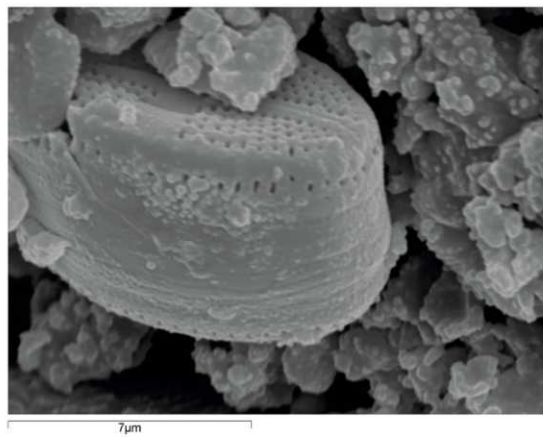


Figura 212

Figuras 211-212: 211. Diatomea, A Trapa (Galicia, España). 212. Diatomea, Hyden Rock (Australia).
(Fotografías Vidal Romani)

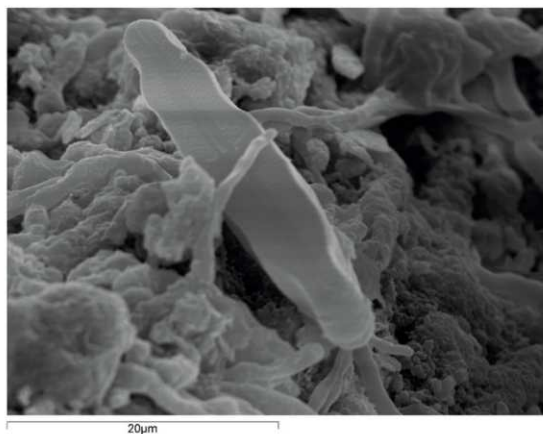


Figura 213

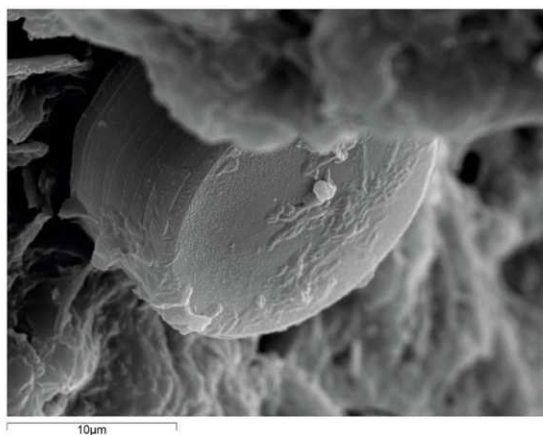


Figura 214

Figuras 213-214: 213. Diatomea, Castelo da Furna (Portugal). 214. Diatomea, Porteliña (Galicia, España).
(Fotografías Vidal Romani)

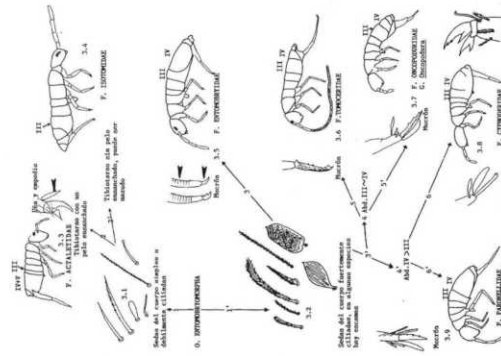


Figura 215

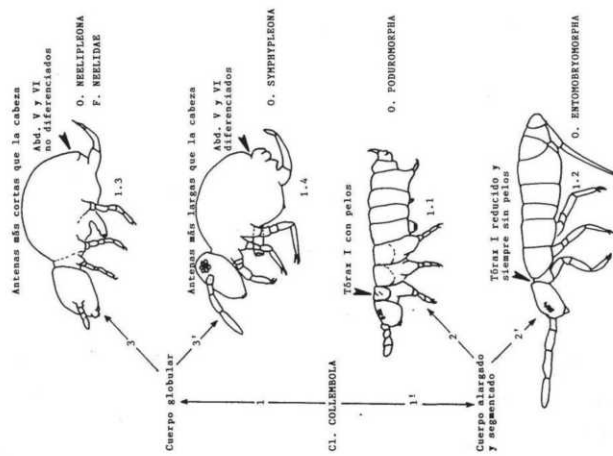


Figura 216

Figuras 215-216: 215. Elementos corporales del Orden Entomobryomorpha (Jordana y Arbea, 1989). 216. Clase *Collembola*: diferentes órdenes según su estructura corporal (Jordana y Arbea, 1989).

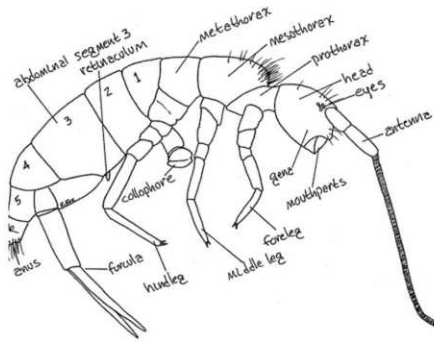


Figura 217

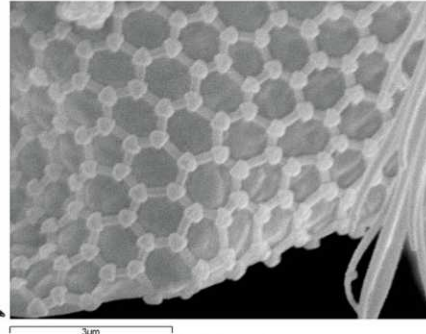


Figura 218

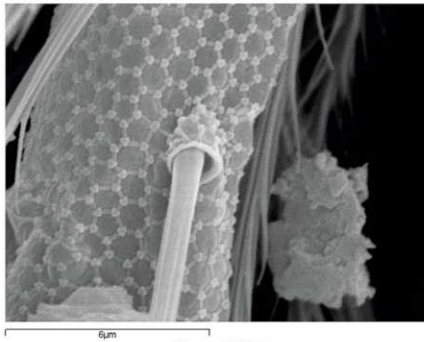


Figura 219



Figura 220

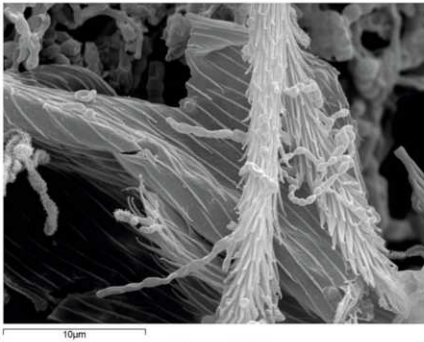


Figura 221

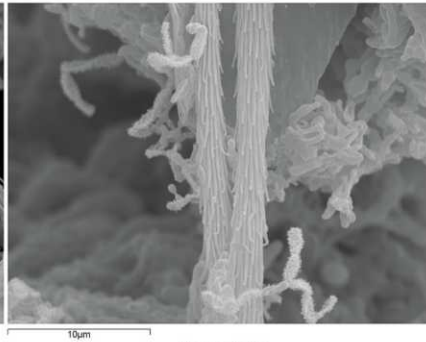


Figura 222

Figuras 217-222: 217. Elementos corporales del orden Entomobryomorpha. 218-219. Granulación cuticular característica del orden Poduromorpha, Los Riojanos (Argentina). 220. Detalle de una seda de colémbolo, Los Riojanos (Argentina). 221-222. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, A Trapa (Galicia, España). (Fotografías Vidal Romani)

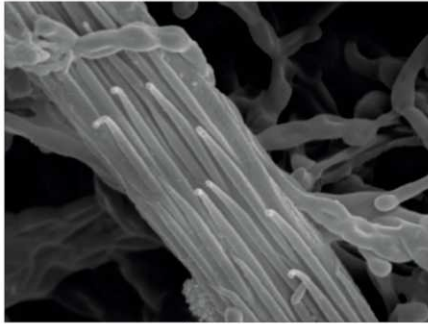


Figura 223

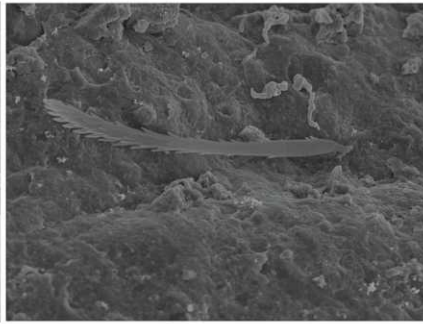


Figura 224

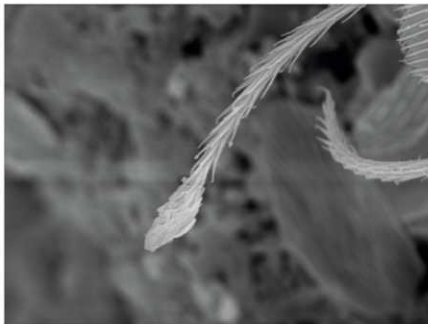


Figura 225



Figura 226

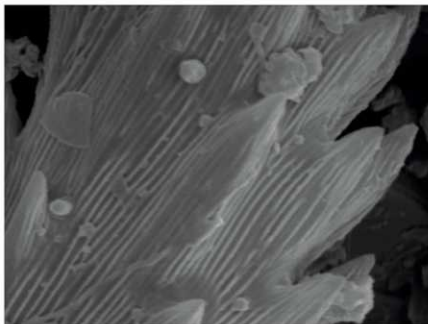


Figura 227

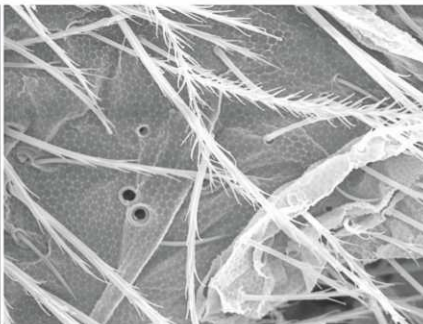


Figura 228

Figuras 223-228: 223. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, A Trapa (Galicia, España). 224. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, Hölick Grottan (Suecia). 225. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, A Trapa (Galicia, España). 226. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, Albarelos (Galicia, España). 227. Detalle de sedas ciliadas de colémbolo, Albarelos (Galicia, España). 228. Granulación cuticular característica del orden Poduromorpha, Pukeberg (Suecia). (Fotografías Vidal Romani)

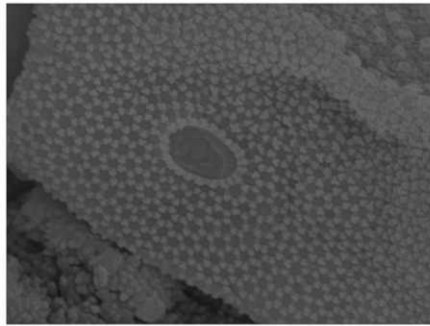


Figura 229

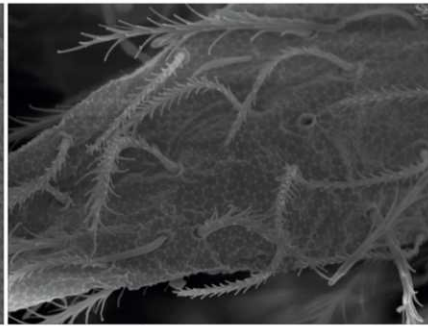


Figura 230

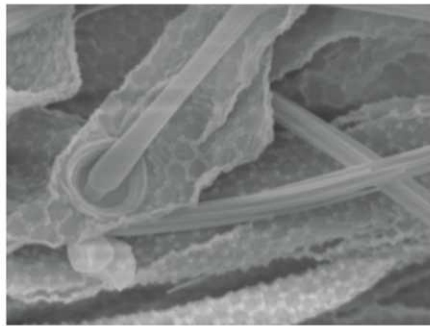


Figura 231

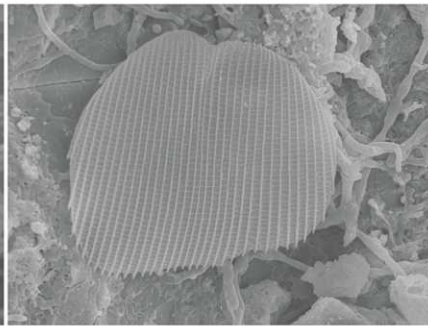


Figura 232

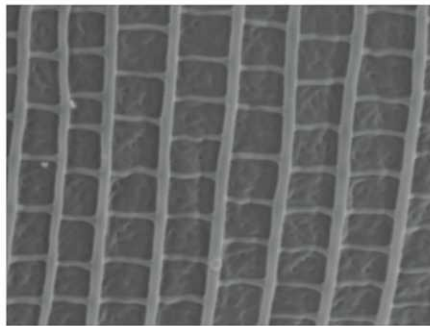


Figura 233

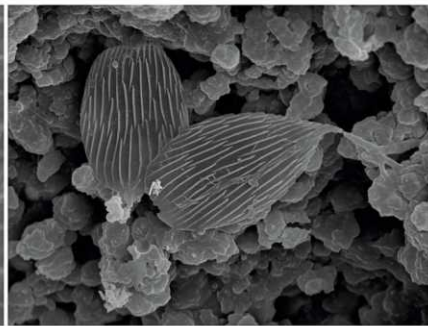


Figura 234

Figuras 229-234: 229. Granulación cuticular característica del orden Poduromorpha, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 230. Sedas de la cutícula de colémbolos, Pukeberg (Suecia). 231. Sedas de la cutícula de colémbolos, Pukeberg (Suecia). 232. Sedas escamosas de la cutícula de colémbolos, Castelo da Furna (Portugal). 233. Sedas escamosas de la cutícula de colémbolos, Castelo da Furna (Portugal). 234. Sedas escamosas de la cutícula de colémbolos, Hyden Rock (Australia). (Fotografías Vidal Romani)

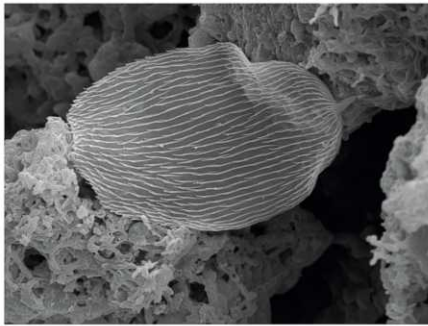


Figura 235



Figura 236



Figura 237

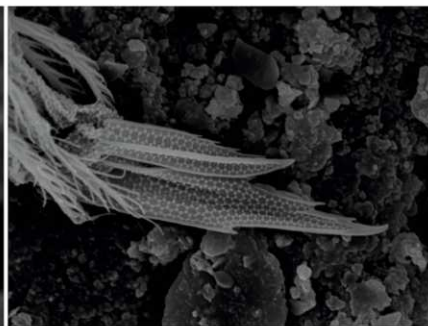


Figura 238

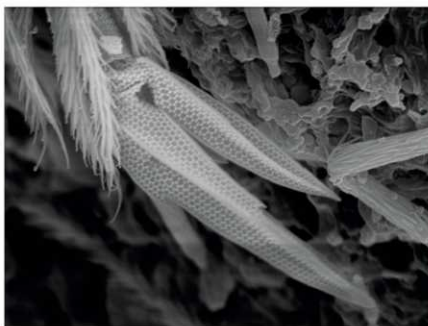


Figura 239



Figura 240

Figuras 235-240: 235. Sedas escamosas de la cutícula de colémbolos, A Trapa (Galicia, España). 236. Sedas escamosas de la cutícula de colémbolos, Murphy's Haystacks (Australia). 237. Uña de apéndice de colémbolo, Murphy's Haystacks (Australia). 238. Uña de apéndice de colémbolo, Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 239. Uña de apéndice de colémbolo, A Trapa (Galicia, España). 240. Mudras de colémbolos sobre microgours del espeleotema, Peña del Hierro (Hueva, España). (Fotografías Vidal Romani)



Figura 241



Figura 242



Figura 243

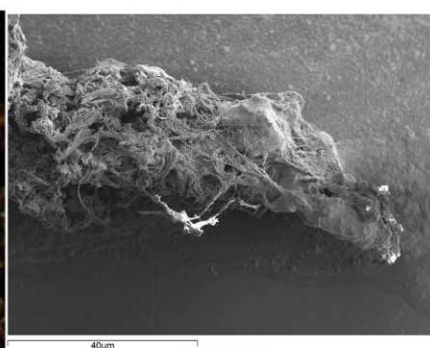


Figura 244

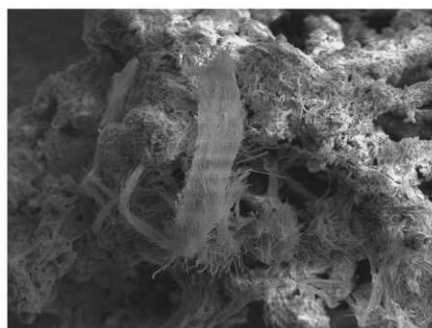


Figura 245

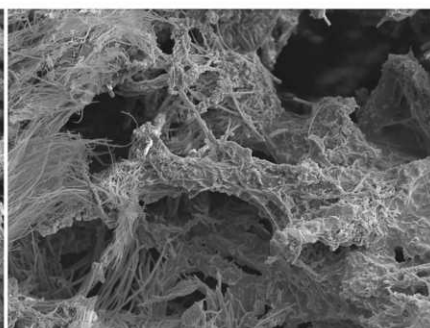


Figura 246

Figuras 241-246: Mudas de colémbolos sobre y formando parte de los espeleotemas. 241. Peña del Hierro (Hueva, España). 243. Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 244. A Cunchosa (Galicia, España). 245. A Cunchosa (Galicia, España). 246. A Cunchosa (Galicia, España). (Fotografías MEB Vidal Romani)



Figura 247



Figura 248



Figura 249

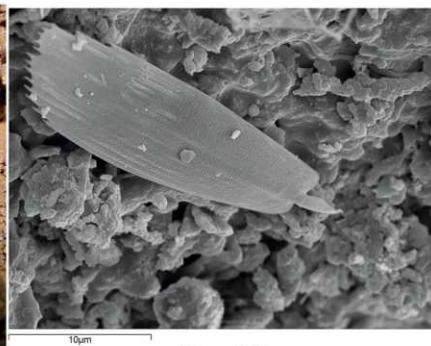


Figura 250

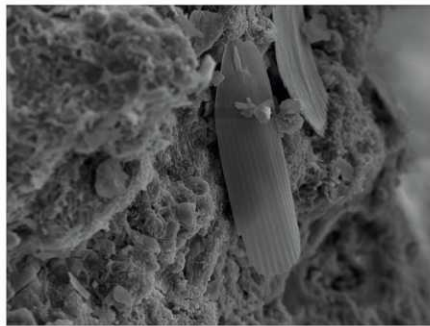


Figura 251

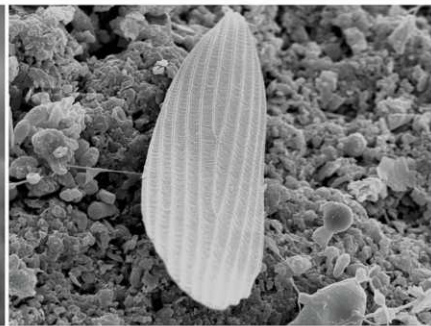


Figura 252

Figuras 247-252: 247 Tisanuros. Cimas de Cabo Silleiro (Galicia, España). 248. Tisanuros. Coviñas (islas Ons, España). 249. Tisanuro sobre espeleotemas. Castelo da Furna (Portugal). 250. Escamas de ala de Lepidóptero vistas en MEB, Las Jaras (Córdoba, España). 251. Escamas de ala de Lepidóptero vistas en MEB. Castelo da Furna (Portugal). 252. Escamas de ala de Lepidóptero vistas en MEB. Las Jaras (Córdoba, España). (Fotografías MEB Vidal Romani)



Figura 253

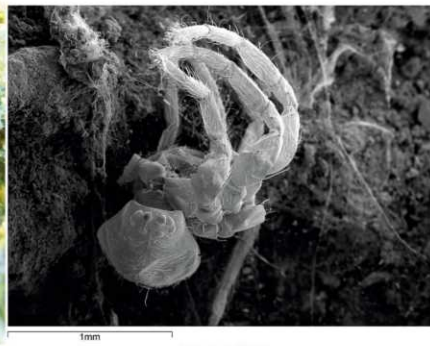


Figura 254

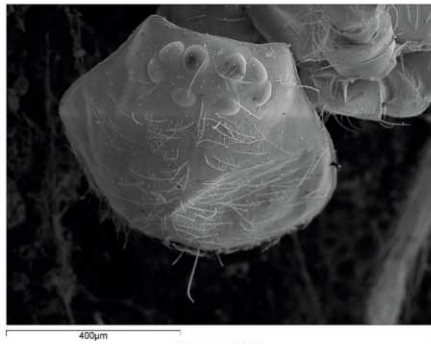


Figura 255



Figura 256



Figura 257

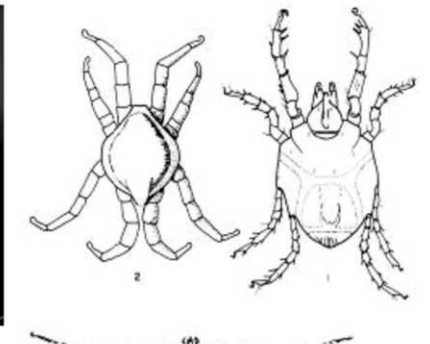


Figura 258

Figuras 253-258: 253. Isópodo, Tui (Galicia, España). 254. Arácnido, Murphy's Haystacks (Australia). 255. Arácnido, Murphy's Haystacks (Australia). 256. Detalle del apéndice de Arácnido, Murphy's Haystacks (Australia). 257. Detalle del apéndice de Arácnido, Murphy's Haystacks (Australia). 258. Tipos de ácaros (Galán, 1993). (Fotografías MEB Vidal Romani)



Figura 259

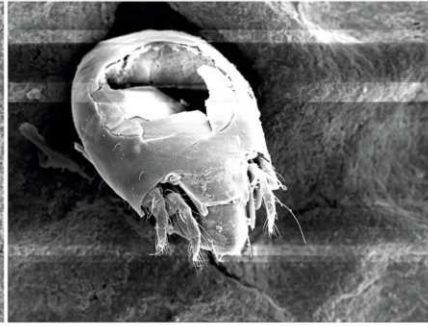


Figura 260



Figura 261



Figura 262



Figura 263

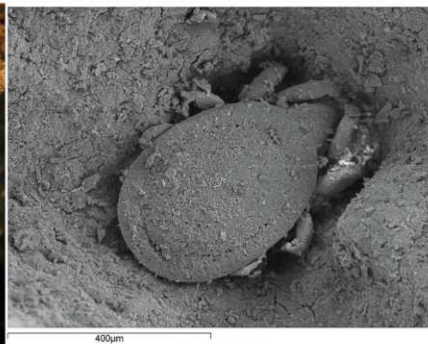


Figura 264

Figuras 259-264: Ácaro, Hyden Rock (Australia). 260-261. Ácaro, Hyden Rock (Australia). 262. Ácaro cubierto por material detrítico camuflado con la textura del espeleotema, Peña del Hierro (Hueva, España). 263. Nidos de ácaros dentro del espeleotema, Las Jaras (Córdoba, España). 264. Ácaro excavando la superficie de un espeleotema, Colegio Liqueño (Argentina). (Fotografías MEB Vidal Romani)

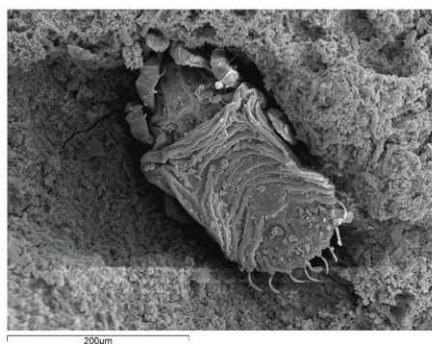


Figura 265

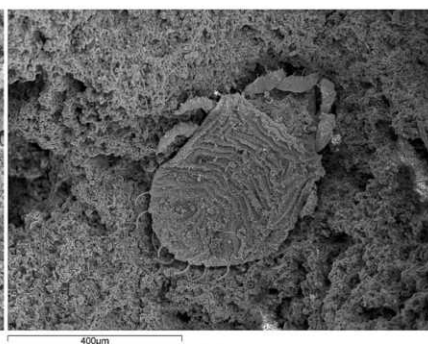


Figura 266



Figura 267

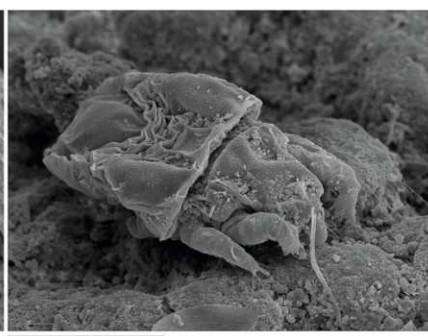


Figura 268



Figura 269



Figura 270

Figuras 265-270: 265-267. Ácaros excavando la superficie de un espeleotema. Colegio Liqueño (Argentina). 268. Ácaros excavando la superficie de un espeleotema. Tcharkulda Rock (Australia). 269. *Salamandra salamandra*. 270. *Chioglossa lusitánica*, A Trapa (Galicia, España). (Fotografías MEB Vidal Romani)



Figura 271



Figura 272



Figura 273



Figura 274

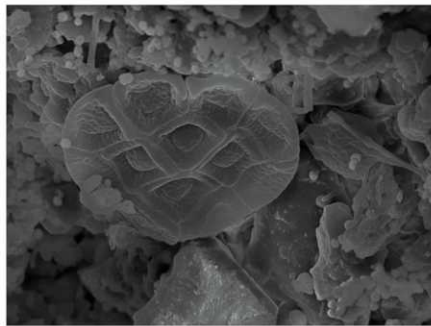


Figura 275

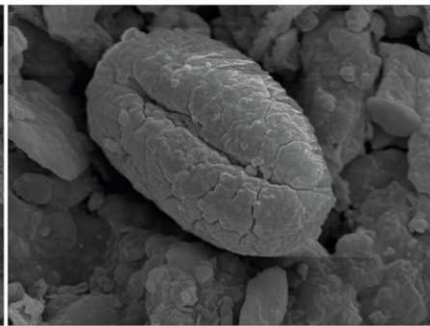


Figura 276

Figuras 271-276: 271. Bufo bufo. 272. Natrix natrix. 273-274. Quirópteros de la familia *Rhinolophidae*, Cueva Morcegos (Galicia, España) (Vidal Romani J.R.). 275. *Acacia* sp., Gundaring (Australia). 276. *Acer* sp., Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). (Fotografías MEB Vidal Romani)

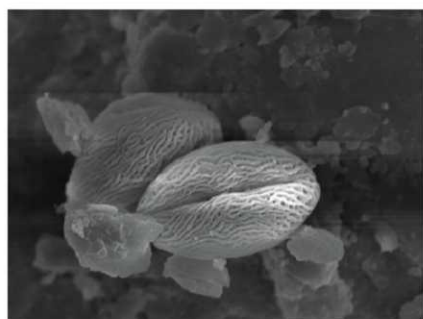


Figura 277

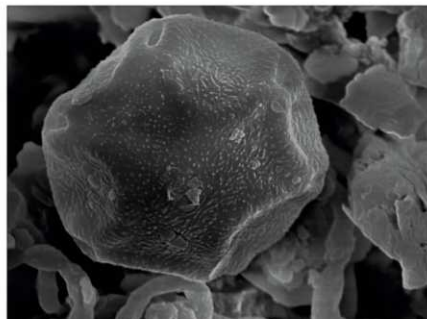


Figura 278

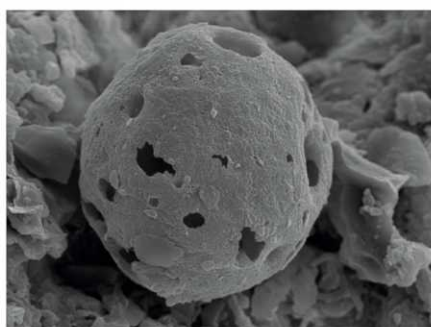


Figura 279

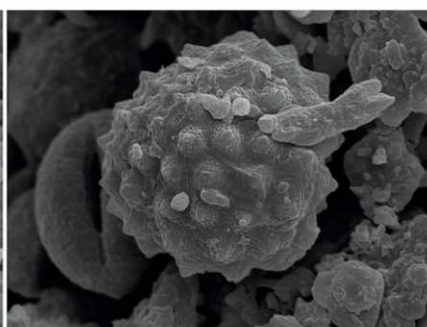


Figura 280

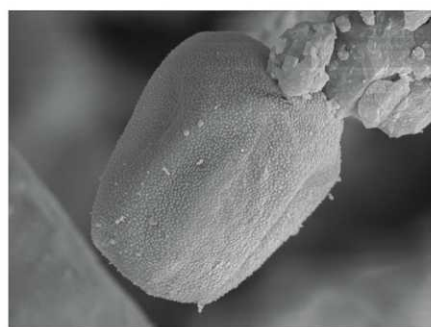


Figura 281

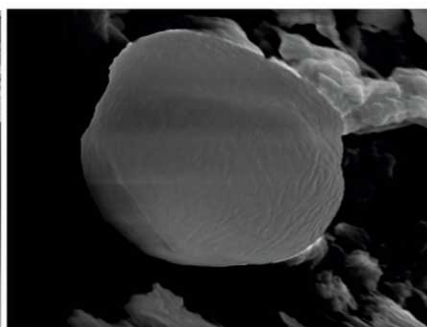


Figura 282

Figuras 277-282: 277. *Ailanthus* sp., El Zapato (Argentina). 278. *Alnus* sp., Castelo da Furna (Portugal). 279. *Amaranthaceae* sp., Castelo da Furna (Portugal). 280. *Asteraceae* sp., Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 281. *Carex* sp., Señor de la Peña (Argentina). 282. *Castanea* sp., Castelo da Furna (Portugal). (Fotografías Vidal Romani)

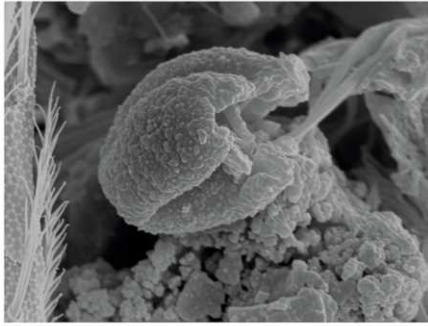


Figura 283

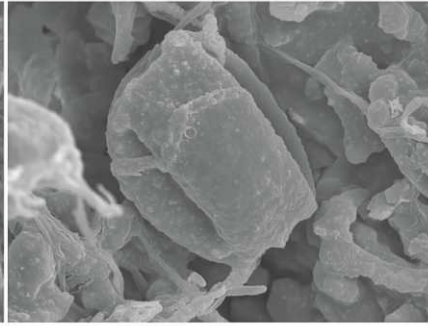


Figura 284

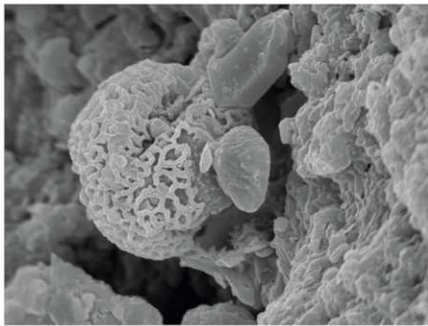


Figura 285

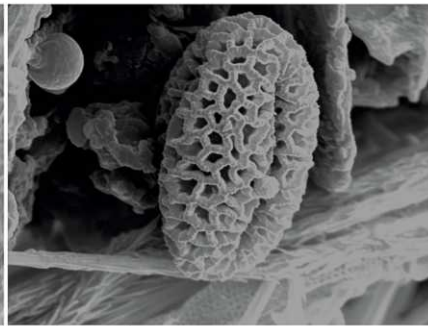


Figura 286

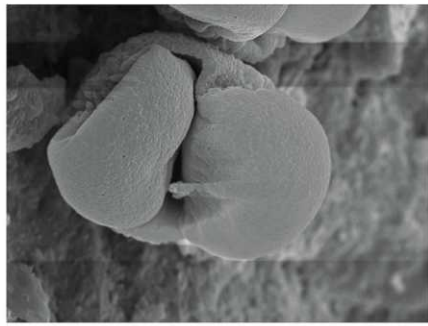


Figura 287

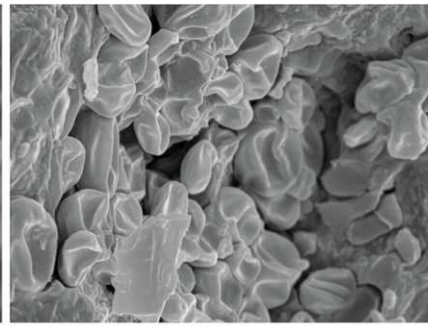


Figura 288

Figuras 283-288: 283. *Cotoneaster* sp., Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 284. *Fagus* sp., Castelo da Furna (Portugal). 285. *Ligustrum* sp., Peña del Hierro (Hueva, España). 286. *Olea* sp., Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 287. *Pinus* sp., Hölick Grottan (Suecia). 288. *Poaceae* sp. (Argentina). (Fotografías Vidal Romani)

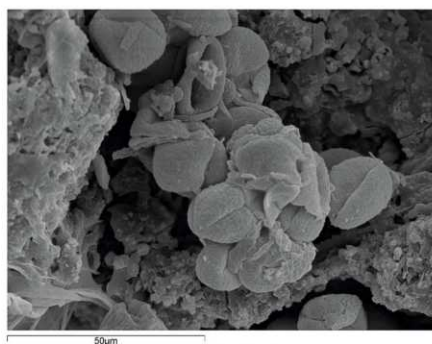


Figura 289

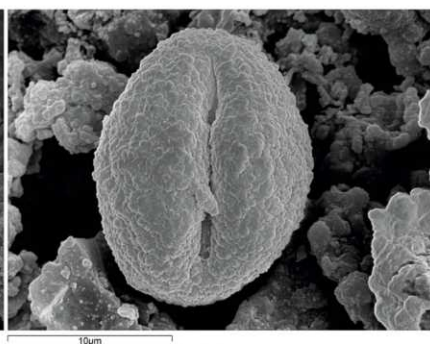


Figura 290

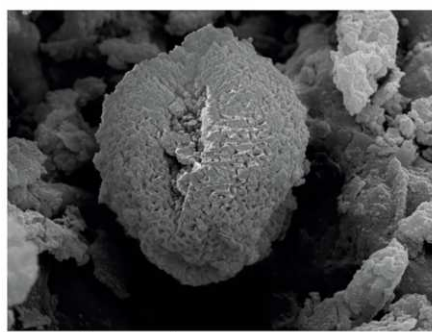


Figura 291

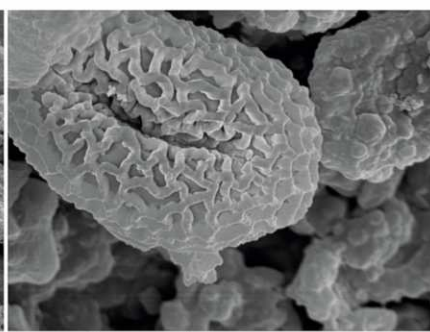


Figura 292

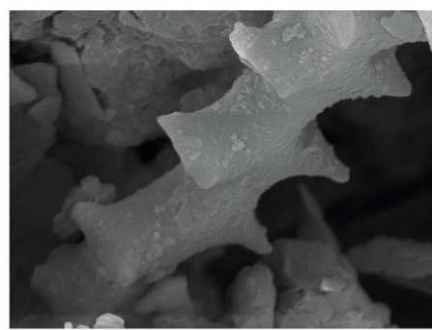


Figura 293

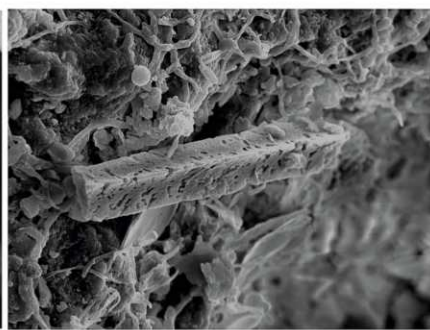


Figura 294

Figuras 289-294: 289. *Quercus* sp., Campofrío (Hueva, España). 290. *Rosaceae* sp., Castelo da Furna (Portugal). 291. *Salix* sp., Castelo da Furna (Portugal). 292. *Tamarix* sp., Berrocal del Rugidero (Extremadura, España). 293. Fitólitos probablemente pertenecientes al género *Carex* sp., Pampa de Achala (Argentina). 294. Posible fitólito, Castelo da Furna (Portugal). (Fotografías Vidal Romani)

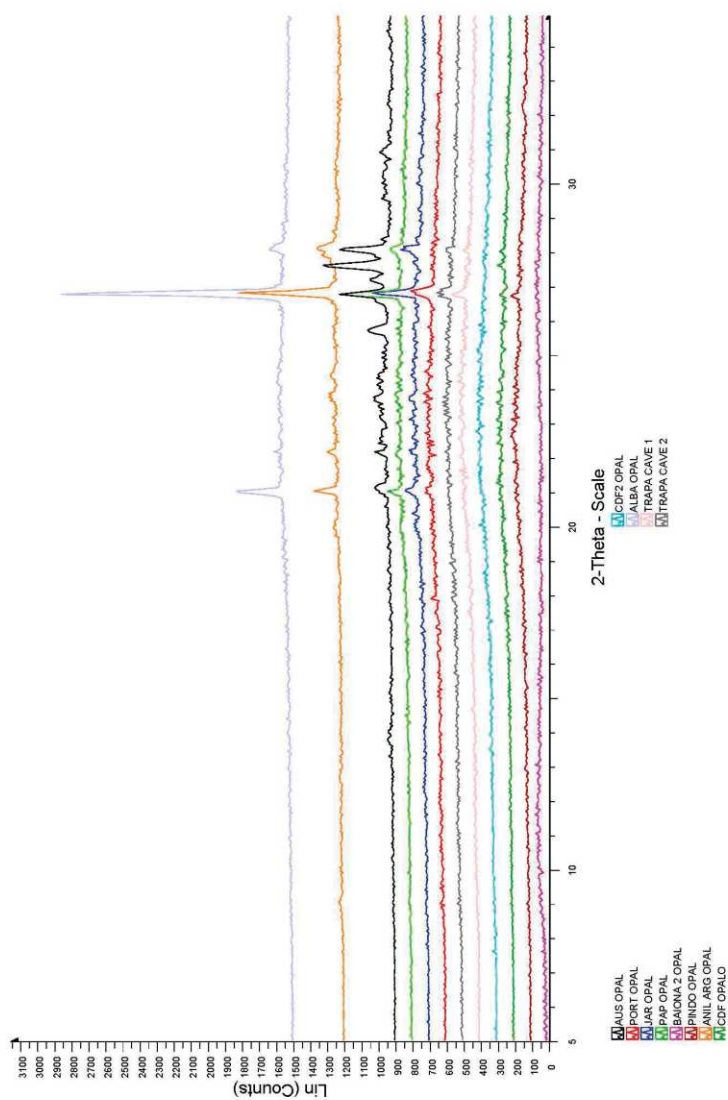


Figura 295. Difractograma de Rayos X donde se observa la estructura del ópalo-A en diferentes localidades, caracterizada por una banda prominente entre 15-30°.

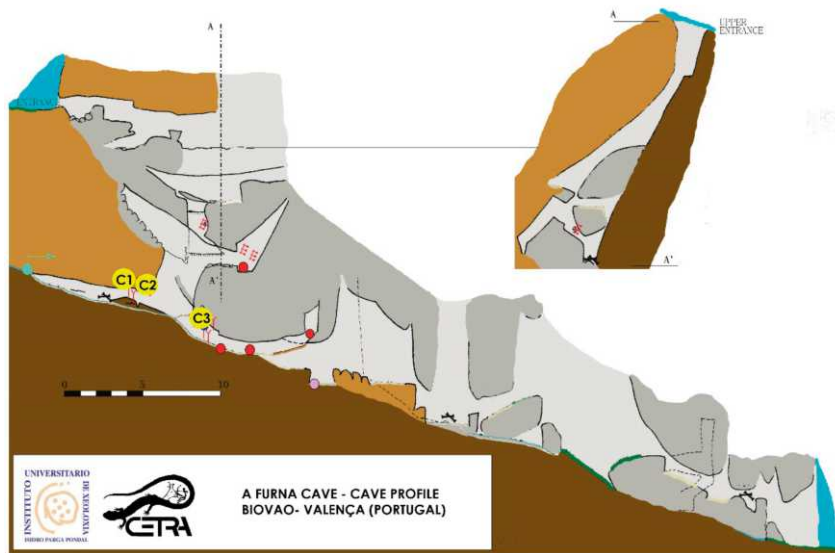


Figura 296. Mapa topográfico de perfil y puntos de muestreo de la cueva "A Furna", Castelo da Furna, Portugal. Portugal, (datos facilitados por Marcos Vaqueiro Rodríguez)

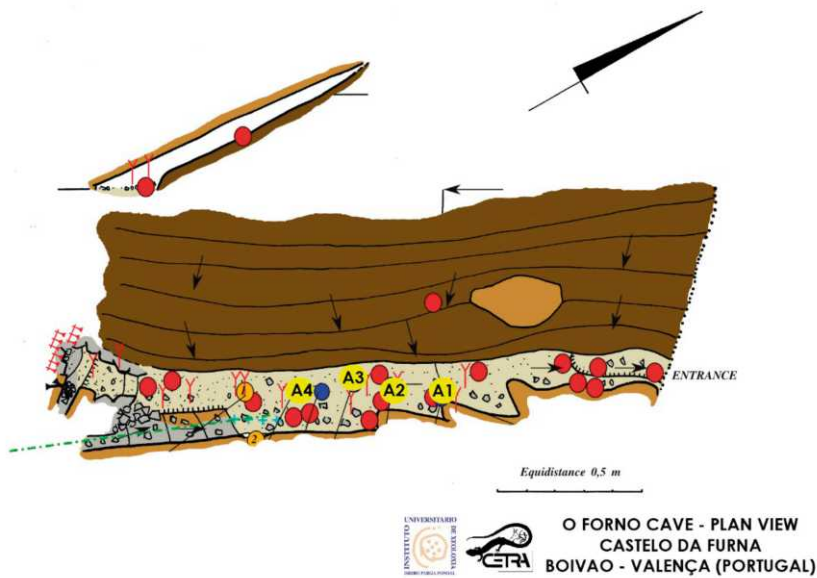


Figura 297. Mapa topográfico y puntos de muestreo de la cueva "O Forno", Castelo da Furna, Portugal, Portugal (datos facilitados por Marcos Vaqueiro Rodríguez)

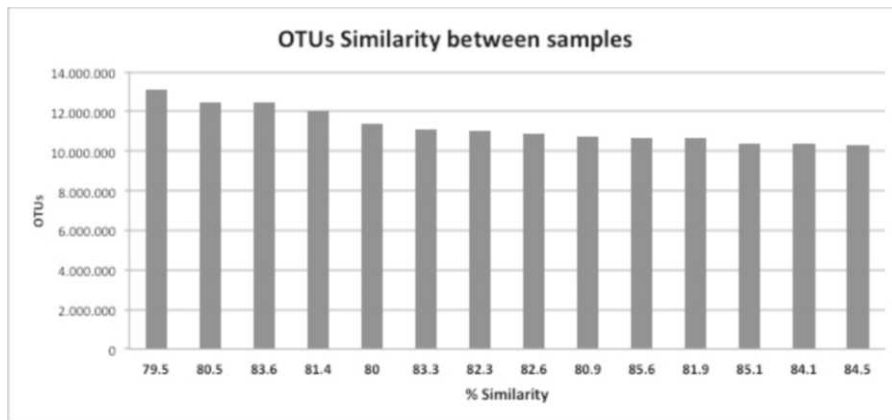


Figura 298. Similitud cuantitativa entre las muestras estudiadas en las cuevas de Castelo da Furna (Portugal).

Capítulo 5

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. LAS CUEVAS GRANÍTICAS SON UN ECOSISTEMA CONSERVADO

En esta tesis doctoral los elementos de estudio de las cuevas son los depósitos o espeleotemas. El análisis de los resultados obtenidos, sobre todo, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, han permitido obtener las siguientes conclusiones:

5.1.1. Los bioespeleotemas como microecosistemas

Las cuevas son un ecosistema específico formado por los organismos vivos que se ven influidos por las condiciones físicas y químicas del entorno. A su vez, dentro de cada cueva, los espeleotemas son igualmente micro ecosistemas específicos con características físico-químicas diferentes y de menores dimensiones (Olsson-Francis *et al.*, 2012) (donde viven los microorganismos y llevan a cabo su metabolismo) (Figura 1). Los microorganismos como los nichos donde estos se alojan, son de pequeñas dimensiones y por ello, muy sensibles a los cambios en las condiciones físico-químicas de esos microambientes (Figura 2), especialmente los cambios en las condiciones de humedad. Es por esto que, en el espeleotema, y sobre todo en la cueva, habrá cambios ambientales que inducen un desarrollo desigual de los microorganismos a lo largo del tiempo y del espacio (en este caso determinado por la disponibilidad de agua). Por ejemplo, en un espeleotema de tan solo 10 milímetros de largo pueden darse diferentes condiciones micro ambientales en la base y en su extremo terminal debido a las diferencias en el contenido de agua, más abundante en el extremo libre que en la base, y por eso suele existir un crecimiento bacteriano diferente en ambos puntos.

En el bioespeleotema existe una sustitución de microorganismos según sea su relación con las necesidades de agua y la disponibilidad de esta en cada etapa. El proceso se desarrolla primero cuando se establecen las comunidades pioneras de organismos, que son las bacterias quimiosintéticas (quimiolitotrofas) que meteorizan el cuarzo y otros silicatos obteniendo la energía de la destrucción de los enlaces minerales. A continuación se desarrollan otras especies de bacterias, algas, hongos, protozoos (amebas) y organismos, como ácaros, isópodos, arácnidos, tisanuros y colémbolos (Cockell *et al.*, 2009; Gorbushina, 2007; Vidal Romaní *et al.*, 2010b; Vidal Romaní *et al.*, 2015) estableciéndose una red trófica característica (Figura 3), hasta formarse la comunidad clímax (comunidad que puede desarrollarse

de forma estable y sostenible bajo las condiciones climáticas que prevalecen en un estadio avanzado de sucesión ecológica) del bioespeleotema.

Esta homogeneidad en las asociaciones de organismos que se observan en cuevas muy distanciadas geográficamente (Vidal Romaní *et al.*, 2015; Vidal Romaní *et al.*, 2014b), indica que la comunidad clímax está lo suficientemente adaptada y es suficientemente diversa, pese a desarrollarse en un ambiente con unas condiciones inusuales. Por esto, los ecosistemas de cuevas subterráneos, aunque son ambientes muy específicos y frágiles, están muy bien conservados (Rajput *et al.*, 2014). Lo mismo ocurre en otro tipo de cavidades como las cuevas de lava ya que, aun existiendo en superficie condiciones muy diferentes de humedad y temperatura, las condiciones internas de las cuevas se mantienen constantes (Vidal Romaní *et al.*, 2015; Northup *et al.*, 2011; Vaqueiro 2017) contrariamente a lo indicado por otros autores (Mulec, 2008). Sin embargo, al igual que en los medios ácidos estudiados por Barton *et al.* (2014), las cuevas estudiadas en esta tesis, tienen una composición de especies diferente a la de los estudios realizados en cuevas de rocas calizas o de tubos volcánicos (Barton, 2006; Coombes, 2015), lo que es de esperar.

En estas cuevas, pese a tratarse de medios oligotrofos, existe una gran biodiversidad que se mantiene en todo su interior, contrariamente a lo indicado por algunos autores (Epure *et al.*, 2017; Tisato *et al.*, 2015). El hecho de que autores (Coombes *et al.*, 2015) afirmen la inexistencia de cierto tipo de organismos en las zonas más profundas de la cueva, es debido a que la metodología aplicada es insuficiente para su detección; ya que es evidente que desde el punto de vista ecológico, es necesaria la presencia de organismos de eslabones inferiores que sirvan de alimento a las comunidades de eslabones superiores. En este caso, el estudio del espeleotema completo desde un punto de vista paleobiológico, y no sólo analizando los microorganismos que viven en superficie como la mayoría de los trabajos en la literatura, ha permitido detectar los microorganismos que representan los eslabones inferiores en las cadenas tróficas (bacterias autótrofas y heterótrofas), y que son los que permiten el desarrollo de los demás organismos. La existencia de estas en las profundidades de las cuevas provoca que el espesor que alcanzan los depósitos sea independiente de la luz y la profundidad a la que se formen, contrariamente a lo señalado por Coombes *et al.* (2015). Esto es debido a que se ha comprobado que existen bacterias que se pueden desarrollar en oscuridad, utilizando un metabolismo quimioautótrofo; incluso en ocasiones las cianobacterias son capaces de cambiar su metabolismo de autótrofo a heterótrofo (Mannan & Pakrasi, 1993; Hiraide *et al.*, 2015). Sí es cierto que, a través de los análisis genéticos de las muestras, se ha visto que las

cianobacterias y organismos fotótrofos como las algas, decrecen en abundancia en cuanto decrece la luz disponible a lo largo de la cueva (Popović *et al.*, 2015; Vidal Romaní *et al.*, 2015; Mulec, 2008).

5.1.2. Flujo de energía y ciclo de nutrientes

Como se ha indicado anteriormente, en estos ecosistemas los microorganismos pueden sustentar y proveer energía suficiente para los organismos de niveles tróficos superiores. Pese a la ausencia de luz y la escasa producción primaria fotosintética, se establece una red alimentaria a base de los detritos, partículas y materia orgánica disuelta, introducida por las aguas infiltradas o por las deyecciones de los organismos que acceden a la cueva. Esto implica una disponibilidad de recursos orgánicos equivalente a la encontrada en suelos; así como un importante reciclaje de nutrientes, sobre todo de nitrógeno (Barton, 2006). Además, un recurso energético importante es el obtenido por los microorganismos quimiolitotrofos (Northup *et al.*, 2013), por lo que no es imprescindible en el desarrollo de las bacterias ni la luz (Coombes *et al.*, 2015) ni la degradación de la roca. Una vez más se confirma que el agua, es el principal factor condicionante para el desarrollo de los microorganismos y consecuentemente de los depósitos.

La disponibilidad de agua permite el crecimiento de las bacterias sobre la superficie de los bioespeleotemas y son las encargadas, junto a los hongos, del reciclaje de la materia orgánica (Figuras 4-7). Los hongos y bacterias, además, contribuyen a la dieta de muchos artrópodos cavernícolas, principalmente en sus fases larvares, pero también al adulto (Cubbon, 1976; Culver, 1982). El resto de organismos incrementan la presencia de materia orgánica, en el caso de los microartrópodos (por ejemplo colémbolos y ácaros), aportan mudas o fragmentos de su cutícula cuando mueren.

En cuanto a las relaciones entre los organismos dentro del ecosistema son interesantes las asociaciones simbióticas, o tal vez sea simplemente saprofitismo, observadas: bacterias sobre amebas, diatomeas o microartrópodos (Figuras 8) (Dattagupta *et al.*, 2009; Stanish & Spear, 2013; Nakayama *et al.*, 2014); así como la acción dispersora de esporas fúngicas y otros microorganismos (Boucias *et al.*, 1988) realizada por los insectos, quirópteros y roedores. Todo ello induce una compleja trama de interacciones entre todos los microorganismos cavernícolas de la macro, meiofauna y microfauna (Figura 3).

Lo más importante en este ecosistema es la adaptación de los microorganismos a sobrevivir en un ambiente oligotrofo llevando a cabo procesos quimiolitoheterótrofos, cuando escasean los aportes de materia orgánica del exterior, participando así en los procesos de erosión de la roca y biomineralización con la generación de los nuevos minerales autigénicos.

5.1.3. Minerales y biomineralización mediatizada por bacterias

El estudio de la mineralogía de los espeleotemas de cavidades desarrolladas en rocas félsicas (granitoides) tiene un gran interés, especialmente en el caso de los minerales y mineraloides autigénicos; que son los que, con mayor efectividad, nos ayudan a describir las condiciones medioambientales que existen en el medio subterráneo. Sin embargo, el pequeño tamaño que tienen y, en especial, su carácter polimineral, complica la determinación de las especies minerales existentes. Por una parte, las pequeñas dimensiones que tienen los espeleotemas, hacen prácticamente inviable la separación y la concentración de los distintos minerales que los integran (tanto de los autigénicos como de los heredados). Por otra parte, ambos tipos de minerales suelen aparecer dispersos en la masa granular que constituye el espeleotema. En algún caso se ha optado por realizar un análisis global por Difracción de Rayos X, que ha proporcionado información sobre el número de especies cristalinas incluidas en el mismo (Figura 9). Sin embargo, este método presenta muchos inconvenientes: se limita a identificar sólo las especies minerales cristalinas heredadas de la roca (cuarzo, feldespato, micas, plagioclasas), que aparecen muy bien representados en los difractogramas, aunque pudiendo enmascarar por su escasez, a los minerales autigénicos (yeso, anhidrita, calcita, aragonito, plumboaragonito, malaquita, halita, ópalo amorfo u Ópalo A, etc.). Este método se ha realizado en pocas ocasiones al ser destructivo de la muestra estudiada y que no siempre producir resultados aceptables. Es así que los estudios mineralógicos se han realizado con un examen previo de la muestra al microscopio estereoscópico con luz natural. Esto ha permitido distinguir, en especial, los minerales heredados: biotita, moscovita, piroxenos, olivino y anfíboles. Además, también se ha optado por la observación e identificación de estos minerales siguiendo dos vías convergentes: realizar análisis semicuantitativos por difracción de electrones retrodispersados al MEB, lo que nos da la composición elemental del mineral estudiado combinado; y para el caso de los minerales idiomorfos, determinación de la simetría a partir del estudio de la morfología del cristal mediante análisis de imagen al MEB. Esta identificación podría llegar a ser muy laboriosa si hubiera un gran número de especies minerales diferentes para identificar. Sin

embargo, el número de especies minerales identificadas es bastante limitado, lo que simplifica el trabajo de identificación combinando ambos criterios.

Gracias a este estudio se ha llegado a la conclusión de que no existe mucha variabilidad en el espectro mineralógico observado en los espeleotemas. Es hasta cierto punto lógico si se considera que la composición química mineralógica de la muestra es muy similar en todos los casos estudiados (Figuras 10-12). Obviamente el elemento más abundante es el Si, principal elemento que forma el ópalo amorfo u ópalo A, y que se ha revelado como esencial para el crecimiento de las bacterias que forman los bioespeleotemas a través del proceso de biomineralización.

La biomineralización es una de las interacciones más importantes entre los minerales y las bacterias (Marnocha & Dixon 2014; Parchert *et al.*, 2012), algas, hongos y líquenes (Tourney & Ngwenya, 2014; Vidal Romaní *et al.*, 2010b; Watkins *et al.*, 2011) que ejercen como agentes espeleogenéticos (Boston *et al.*, 2009) para la formación de los bioespeleotemas. Estos contienen trazas de vida fósil y su estudio ofrece información sobre la historia de la vida primitiva en la Tierra, demostrando la importancia de los minerales en los procesos de obtención de energía por los primeros organismos (Phoenix & Konhauser, 2008; Li *et al.*, 2013; Southam, 2012). Los biominerales que se pueden formar son carbonatos, fosfatos, mineraloides de silicio (no silicatos como erróneamente los llaman muchos autores), sulfatos, sulfitos, óxidos e hidróxidos con diversos cationes como hierro, calcio, magnesio y manganeso (Lowenstam, 1981; Weiner & Dove, 2003).

La carbonatación bacteriana puede ocurrir de una forma activa mediante fotosíntesis, hidrólisis de urea o reducción de sulfato y hierro, o de forma pasiva como simples núcleos de precipitación o nucleación (Baskar *et al.*, 2014). En cuanto al silicio, no hay pruebas de que los procariotas puedan inducir la precipitación de silicio (Konhauser *et al.*, 2004). Por el contrario, los grupos funcionales de las paredes bacterianas y la excreción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proporcionan medios reactivos para la acumulación de ópalo biogénico, gracias a la polimerización autocatalítica (Benning *et al.*, 2004) realizada a baja temperatura en presencia de biofilms microbianos (Handley *et al.*, 2005) que crean el ambiente adecuado. Una vez formado el ópalo biogénico, y debido a su mayor solubilidad (100 veces mayor que el cuarzo cristalizado), las bacterias en presencia de agua lo utilizan fácilmente como medio de crecimiento, ya que se solubiliza rápidamente. Algunos autores (Cockell *et al.*, 2013), demuestran que la biometeorización es hasta 7 veces mayor que la meteorización no biológica y determinan tasas de liberación de silicio (de los minerales

silicatados) del orden de hasta $144,7 \times 10^{-12}$ moles/m²/s. En estudios sobre la meteorización bacteriana de vidrios basálticos de Islandia, erróneamente se atribuye la mayor abundancia de bacterias en los productos de meteorización, como más fácilmente solubilizables por la actividad bacteriana que la roca intacta, confundiendo causa y efecto. Lo que sí ha sido observado repetidamente, es que las rocas con mayor proporción de silicio son aquellas donde mejor se desarrollan los depósitos de ópalo biogénico.

5.1.3.1. Ópalo amorfo

Es el biomineral más frecuente en los espeleotemas asociados a restos biológicos y por ello se denominan bioespeleotemas (Vidal Romaní *et al.*, 2015). Otros autores sin embargo, (Daza & Bustillo, 2014c) consideran los bioespeleotemas como simples depósitos minerales pasando por alto el papel de la actividad biológica de las bacterias primero atacando la roca y posteriormente contribuyendo activamente a la precipitación del ópalo amorfo un proceso que se describe en el apartado 5.2.3.

5.1.3.2. Sulfato de calcio (yeso)

En la formación de los microcristales de yeso intervienen: el Ca procedente de los minerales heredados (anfíboles, anortita) y el S procedente descomposición de la materia orgánica (Franklin *et al.*, 1994; Welch & Ullman, 1996) bacteriana en respuesta a estrés hídrico (Raina *et al.*, 2013), del agua de infiltración que trae consigo aerosoles atmosféricos de diferente origen (volcánico, incendios, tormentas eólicas y spray marino) o de la materia orgánica (guano, detritus) que se acumula normalmente en este tipo de cavidades (Forti, 2001).

Cuando el agua escasea se produce un cambio en los procesos de cristalización y empieza a formarse, en su lugar, la anhidrita. Este sutil cambio, se ha detectado estudiando la simetría cristalina que pasa de ser monoclínica (yeso) a ortorrómbica (anhidrita) y que al estar maclada, puede aparentar que corresponde a una simetría de orden superior (hexagonal) (Figuras 13-14).

5.1.3.3. Halita

La aparición de cristales de halita es anecdótica, por lo que no podemos pensar que se trate de un proceso generalizado. Puede producirse en entornos próximos a la línea

de costa aunque también se trata de un mineral típico de ambientes evaporíticos continentales o costeros.

5.1.3.4. Calcita

Se ha constatado la presencia de microcristales de calcita en los espeleotemas estudiados en esta tesis, como también han sido mencionada su existencia en otras rocas magmáticas básicas o ultrabásicas: diabasas (Sallstedt *et al.*, 2014), sienitas (Vidal Romani *et al.*, 1997), granodioritas (Vidal Romaní y Vilaplana, 1983), o basaltos (Woo *et al.*, 2008). Esta particularidad se explica porque, pese a no tratarse de rocas carbonatadas, los organismos meteorizan la roca y ponen en disolución el Ca de los feldespatos para la formación de este mineral.

5.1.4. Participación de los medios subterráneos en los ciclos biogeoquímicos

Hay diversos ciclos que juegan un importante papel en las cuevas estudiadas aquí. Uno de ellos es el del carbono, por todos los organismos que intervienen en la formación de los espeleotemas. Otro ciclo es el del nitrógeno, ya que las cuevas acogen temporalmente poblaciones de quirópteros que contribuyen al desarrollo de las comunidades de bacterias guanobias (Riquelme *et al.*, 2015b). El tercer ciclo que interviene en estos medios subterráneos es el del silicio, ya que los bioespeleotemas están mayormente formados por este elemento químico, el más abundante en las rocas graníticas.

5.1.4.1. El ciclo del silicio

El silicio, transportado en disolución por los ríos, es el aporte más importante al ciclo global del silicio (Clymans *et al.*, 2015). Este ciclo está dividido en dos subciclos (Frings *et al.*, 2014) de igual orden: uno en el continente y otro en el océano. La principal fuente de silicio para los océanos es la aportada a través de la red de drenaje en forma de H_4SiO_4 disuelto siendo su origen las rocas silicatadas continentales (Van Cappellen, 2003). Los ríos y las cuevas son el nexo de unión de ambos y, los espeleotemas reservorios de sílice amorfa biogénica debido a la interacción roca-microorganismos. Por esto, no todo el silicio proveniente de los suelos terrestres y roca se deposita en el mar, sino que queda atrapado en los suelos, sedimentos, acuíferos y una pequeña parte en los depósitos de los ambientes subterráneos. Sin embargo, el transporte de silicio desde tierra al mar que se realiza de forma continua no alcanza valores significativos más que a una escala de tiempo del orden de 100000

años (Van Cappellen, 2003). La sílice amorfa en muchos casos procede de los fitolitos de las plantas (cultivadas o naturales), pero en su mayor parte del silicio proveniente de la meteorización química, física y biológica de la roca por los microorganismos, lo que incrementa la concentración de silicio en el agua de escorrentía a más de $2.6 \pm 1.1 \text{ g Si kg}^{-1}$ (Clymans *et al.*, 2015).

El silicio es uno de los elementos más importantes en las cuevas estudiadas debido a que es el principal responsable del mantenimiento de ciertas formas de vida en estos ambientes. Los organismos utilizan el silicio procedente de los silicatos meteorizados para construir elementos estructurados de sílice amorfa u ópalo biogénico a través del proceso de biomineralización (Van Cappellen, 2003) descrito por la siguiente reacción: $\text{H}_4\text{SiO}_4(\text{aq}) \Leftrightarrow \text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}(\text{s}) + (2 - n)\text{H}_2\text{O}(\text{l})$.

En los depósitos estudiados, las diatomeas forman sus frústulos de silicio a partir de ácido silícico disuelto y una vez muertas se produce la disolución de los mismos, regenerándose el H_4SiO_4 debido a los altos grado de subsaturación del agua respecto a la sílice biogénica.

Las paredes celulares de ciertos hongos y las testas de las amebas testáceas, organismos muy abundantes en el espeleotema, son reservorios de Si en este ciclo, ya que tienen un papel fundamental en la fijación e incorporación del Si en sus estructuras celulares (González *et al.*, 2013; Vidal Romaní *et al.*, 2010b). El papel de las amebas testáceas en el ciclo del silicio es parecido al de las plantas superiores, ya que, aunque sea pequeño su tamaño, su tiempo de generación y reciclaje de materia es muy rápido (Aoki *et al.*, 2007). Éstas tienen un papel muy importante en el ciclo del silicio debido a la alta solubilidad del ópalo amorfo o biogénico que forma sus testas (Aoki *et al.*, 2007). También se han observado casos de amebas testáceas aglutinadoras que a veces captan frústulos de diatomeas para formar sus testas. Esto muestra una gran competencia por la captura del silicio disponible entre diatomeas y amebas testáceas, que en caso de escasez de Si o de agua, son capaces de aglutinar los frústulos de las diatomeas para completar sus testas.

5.2. GÉNESIS DE LOS BIOESPELEOTEMAS

5.2.1. Introducción

La principal diferencia entre los espeleotemas estudiados habitualmente en cuevas y los bioespeleotemas estudiados en esta tesis doctoral es la génesis. El proceso abiótico, en el caso de las cuevas de rocas calcáreas, se produce debido a que el

agua cargada de CO_2 adquirido durante su circulación a través del suelo, transforma los carbonatos poco solubles en bicarbonatos solubles. Éstos, al llegar al interior del carst y en contacto con la atmósfera de la cueva, ceden CO_2 perdiendo capacidad de retención del bicarbonato cálcico, precipitándolo y formando los espeleotemas. Para la génesis de los depósitos estudiados en esta tesis, basta la existencia de una cavidad, independientemente del tamaño que tenga, y un suministro mínimo de agua. Este puede ser a modo de pequeños escurrimientos o por condensación de la humedad de la atmósfera de la cueva, que no está directamente relacionada con la época de lluvias, sino con la atmósfera sobresaturada de la cueva. La masa de aire que está en contacto con la superficie de la roca, alcanza la temperatura de punto de rocío y hace que sobre esta aparezca una lámina de agua, fruto de la condensación que ha provocado esa diferencia de temperatura (menor en la superficie de la roca y mayor en la atmósfera de la cueva) (Vaqueiro, 2017). Las cantidades de agua movilizadas son escasas y su movimiento dentro de la cueva se ve influenciado por tensiones, normalmente no consideradas en otros tipos de cavidades. Es el caso de la capilaridad (Figura 15), ascensos del agua desde el recubrimiento sedimentario del suelo de la cueva, con una pequeña dinámica que permitirá el establecimiento de comunidades microbianas, que se encuentran en las muestras intactas. Sin embargo, en otras zonas de la cueva o del espeleotema, la dinámica es mayor y aparecen los restos orgánicos de distinta procedencia muy destruidos, acumulándose juntos para su posterior agregación. En estos casos se puede intuir una cierta orientación de estos organismos, dado que a menudo se establecen los restos más caóticos y detriticos en la región basal (se han observado testas de amebas desintegradas). Por el contrario, en el ápice o extremo, aparecen colonias de organismos filamentosos vivos y amebas enteras, debido a la menor dinámica que indica la dirección de crecimiento y hacia donde se traslada el agua.

Finalmente, los estudios realizados tanto en la cueva como en gabinete permitieron observar la similitud de las muestras y los diferentes estados de desarrollo en los que éstas se encontraban. Así como se estableció la secuencia del proceso de construcción de los bioespeleotemas y los fenómenos que dan lugar a su formación, donde los microorganismos ejercen una gran influencia. Concluyéndose que es un proceso generalizado en todo el mundo y que consta de 4 etapas diferenciadas (Figura 16) y excluyentes, que se pueden producir a la vez en diferentes microzonas del depósito, pues la humedad puede cambiar a lo largo del mismo (Figura 17). El ciclo se realiza de húmedo a seco debido al agua infiltrada hacia el interior del macizo, y se repite indefinidamente mientras existan nuevos aportes, por muy espaciados en el tiempo que sean. En la época seca, primero sedimentará la carga a tracción y

finalmente la carga disuelta en el agua que precipita por sobresaturación; dando lugar a los bioespeleotemas, llamados así por su estrecha relación con la actividad biológica (Forti, 2001) y cuyo proceso de formación es llamado bioespeleogénesis (Barton, 2013).

5.2.2. Etapa 1: Etapa detrítica o de acumulación de clastos

En los afloramientos de rocas magmáticas, la escorrentía circula superficialmente, hasta que se infiltra hacia su interior a través de las discontinuidades (cuando están abiertas) que definen la permeabilidad secundaria de la roca. La baja solubilidad de los minerales que forman las rocas magmáticas en agua a temperatura ambiente, es la razón que explica las limitaciones en la formación y desarrollo de los espeleotemas en cavidades de rocas magmáticas. En esta etapa, la roca se desintegra por meteorización física creándose una acumulación de clastos de feldespatos, micas y cuarzo, que darán un aspecto detrítico caracterizado por su fábrica porosa, abierta, grano soportada y con capacidad para almacenar agua intersticial (Figuras 18-20).

Otro factor limitante en la formación de los espeleotemas es que el fluido, en nuestro caso el agua, se debe movilizar muy lentamente para formar espeleotemas, pues a mayor velocidad predomina la erosión. Ambos factores: baja solubilidad y escasa velocidad del flujo de agua, explican que los espeleotemas en las primeras etapas (antes de la colonización por parte de los microorganismos) estén formados por partículas minerales producidas por la meteorización física o mecánica de la roca en contacto con el agua. Este proceso de formación del aglomerado de granos minerales angulosos, esencialmente estará controlado por los ciclos de humectación-desección.

5.2.3. Etapa 2: Colonización de microorganismos

Una vez que la roca se ha desintegrado, sus clastos forman la fábrica porosa que retiene la humedad y que va a ser colonizada por los microorganismos (Figura 20). Respecto a su acción en la meteorización de los minerales autigénicos cristalinos (carbonatos, fosfatos, sulfatos, evaporatos, silicatos), o amorfos (ópalo A, hidróxidos de hierro, de aluminio) cuando el agua se evapora (Vidal Romaní *et al.*, 2015), destaca la formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como acetato, oxalato, formato, propionato, lactato, piruvato, citrato, succinato y α -cetoglutarato; que influyen en el pH del medio y afectan a la solubilidad de los minerales de la roca (Sanjurjo *et al.*, 2006). Esto es debido a su acción quelante, que incrementa la meteorización

bioquímica de los minerales del granito (Barker *et al.*, 1998; Christner *et al.*, 2014). La formación de estos compuestos metabólicos acelera la disgregación del cuarzo induciendo a la formación de mineraloides como el ópalo-A, el cual es quince veces más soluble que el cuarzo cristalino (Figura 21) y esto, permitirá que el Si vuelva a estar disponible más rápido en una nueva fase de biometeorización (Vidal Romaní *et al.*, 2003).

Los microorganismos presentes se desarrollan mediante biofilms o biopelículas (agrupamientos de células bacterianas adheridas a una superficie y encerradas en una matriz adhesiva excretada por las células) sobre la roca para protegerse del medio y acumular los pocos nutrientes presentes en la cueva, así como macromoléculas y coloides (Tapia Quezada, 2010). Para ello, excretan sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que forman una compleja matriz compuesta de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Flemming & Wingender, 2001) en el exterior de las membranas celulares. Ejercen un papel fundamental en los procesos de cohesión celular en el biofilm, adhesión a superficies minerales (Gong *et al.*, 2009), quelación de metales y precipitación de compuestos minerales (Tourney & Ngwenya, 2014; Flemming & Wingender, 2001). La matriz creada por las EPS, además, es caracterizada por poseer carga negativa que participa en los cambios químicos con el sustrato, induciendo la absorción de cationes, captando restos detríticos fruto de la desintegración física de la roca y disolviendo moléculas orgánicas. Este desarrollo biológico en las superficies se produce debido a que la adhesión es una manera de permanecer en un hábitat favorable y no ser arrastrados por el agua captando, además, los nutrientes que se adsorben a ellas y obteniendo más recursos. Estos crecimientos bacterianos forman biopelículas superpuestas y concéntricas que permiten el desarrollo, en todas direcciones, de los espeleotemas cilíndricos de suelo y pared.

Este crecimiento se inicia en presencia de agua que asciende por las paredes de las matas, formando hacia arriba pequeñas protuberancias (Figuras 22-24) que, gracias a la atracción de más humedad por capilaridad, finalmente crean un espeleotema cilíndrico. Cada unidad formadora de colonia (u.f.c.) (Figura 25) sufre un crecimiento exponencial en vertical si las condiciones del medio son las idóneas (Bojanowski & Trivedi, 2015), creando una protuberancia biológica que agrega material detrítico, formándose finalmente un espeleotema cilíndrico (Figura 26). Así, el crecimiento de los espeleotemas se orienta según la proliferación de estas colonias bacterianas que, a su vez, está relacionado con la disponibilidad y distribución del agua. Si estas crecen aisladas pero en el seno de un espeleotema, se podría apreciar el espacio entre ellas

(Figuras 27-29), que más tarde se rellena cuando se evapora el agua y precipitan los elementos disueltos, agregando material detrítico y produciendo la unión de los puntos de crecimiento con la precipitación final del ópalo amorfo (Figura 30). Estos se forman en contra de la gravedad como las helictitas estudiadas por Tisato *et al.* (2015) gracias al papel activo de la microbiota en el proceso de mineralización, creando sitios de nucleación mediante quimiotaxis que afecta a la orientación del crecimiento, determinando la estructura macroscópica del espeleotema. Sin embargo, en los espeleotemas que crecen en el techo de la cavidad, la gravedad ejerce una indudable influencia en la lámina de agua que se deformará por alargamiento, creando el medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos en dirección vertical o subvertical (Figura 31).

En este tipo de crecimiento a modo de láminas superpuestas de microorganismos que agregan partículas, las EPS son probablemente las mayores responsables del mecanismo de aglomeración, transportando y limitando la dispersión de nanopartículas a través del biofilm (Tourney & Ngwenya, 2014). Es decir, las EPS y la sílice proporcionan el “adhesivo” mediante el cual se forman las microbiolitas (Tourney & Ngwenya, 2014) al igual que actúan ciertos adhesivos de sílice de uso sanitario para unir tejidos vivos (Rose *et al.*, 2014). De la misma forma, las células bacterianas, los restos biológicos y las partículas minerales existentes en el medio, se intercalan entre las láminas de ópalo A formadas cuando se evapora el agua del hidrogel de silicio y precipita; incrementándose así la fuerza adhesiva por deshidratación (Rose *et al.*, 2014). Mediante este proceso el espeleotema crece en sucesivos ciclos de aporte de agua formando una estructura en láminas superpuestas. Además de las EPS de estos biofilms, también tienden a incrementar la cohesión entre los sedimentos, los microorganismos filamentosos enlazados (Vignaga *et al.*, 2012). Este material se vuelve muy resistente al estrés de cizalla aplicado por el movimiento de fluidos suprayacentes (Vignaga *et al.*, 2012) que en ocasiones crea los microgours típicos.

Además, dependiendo de la superficie y de la mineralogía de la roca se establecerán unas bacterias concretas; y dependiendo del tipo de bacteria que se establezca, ciertos elementos serán interceptados o no por los EPS bacterianos, según se establezcan o no interacciones. De manera que los elementos que no establezcan interacciones se lavarán y no formarán parte del espeleotema (Tourney & Ngwenya, 2014).

5.2.4. Etapa 3: Formación del hidrogel de silicio y precipitación de ópalo A

Como se ha dicho anteriormente, los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de los microorganismos (Bennett, 1991) tienen una influencia activa en la disolución de los clastos minerales, afectando principalmente al Si (Benning *et al.*, 2004). Este se incorpora al agua creando un hidrogel que resulta ser un ambiente favorable para la cristalización de minerales, un medio adecuado para el desarrollo de las bacterias (Service, 2016, Trollope, 1975) y para que otros microorganismos, como amebas testáceas y diatomeas, puedan fabricar sus testas y frústulos respectivamente. Esto hace pensar que sobre la superficie de estos depósitos, también se crean medios de cultivo idóneos para el desarrollo y conservación de microorganismos de una forma natural, como los utilizados por Dietz & Yayanos (1978) y Thatcher & Weaver (1974). El motivo por el que el hidrogel de silicio es viable para el desarrollo de vida, es debido a que posee suficiente porosidad para la difusión del oxígeno, y a la vez, mantiene a las células aisladas de las condiciones del exterior, lo que permite a los organismos aeróbicos realizar sus actividades metabólicas (Taylor *et al.*, 2004; Trollope, 1975) pero protegidos.

Este hidrogel de silicio, cuando los aportes de agua cesan, se deshidrata y precipita como ópalo A (Watkins *et al.*, 2011) formando nanoesferas que aumentan su tamaño y se van agregando en largas redes, dando un aspecto rugoso en superficie. Primeramente, el hidrogel de silicio se vuelve viscoso (Figuras 32-33) formando las nanoesferas de aproximadamente 404 nm de diámetro (Figuras 34-35) (Cortés Escobedo, 2005). Estas se agregan hasta formar una capa continua, incluso como recubrimientos de los microorganismos (Peng & Jones, 2012; Konhauser *et al.*, 2001) (Figuras 36-39) que se van uniendo (Figuras 40-41) para formar agregados de mayor tamaño y construir una película continua de ópalo A (Figuras 42-47). A veces presenta contornos lobulados (Figura 48) y deja huecos en las zonas donde el hidrogel no llegó a recubrir la superficie del espeleotema (Figura 49). Esto permite, en algunos casos, observar la fábrica del material sobre el que precipita el ópalo A (Figuras 50-51). Este proceso ocurre, como se ha mencionado, en capas sucesivas y superpuestas de láminas homogéneas y lisas de ópalo A (Figuras 52-53) dejando entrever entre las grietas de retracción su estructura interna de nanoesferas (Figura 54) y las capas inferiores sobre las que se ha depositado (Figuras 55-56). Estas grietas se deben al proceso de desecación previo a la metalización de la muestra para su observación al MEB y son debidas al agua de hidratación del bioespeleotema. Este secado por evaporación se origina por presión capilar y el gel seco resultante que reduce su

volumen se llama xerogel (Páez, 1991) y muestra cierta viscosidad (Figuras 57-58). Es importante destacar que esta precipitación del ópalo A tiene lugar en un medio subaéreo y no subacuático como han indicado otros autores (Daza & Bustillo; 2012). Otro motivo por el que sería cuestionable, es porque se ha visto que en las cuevas estudiadas en este trabajo, existen zonas donde la circulación del agua impide la sedimentación, y predominan los procesos de erosión y transporte de los materiales desintegrados en la superficie de la roca. Es por esto que una extrema circulación o inundación por el agua impediría la formación de estos depósitos. Un ejemplo de este fenómeno es la cueva de “A Cunchosa” (Galicia), en la cual existe un río subterráneo que cambia de nivel con las crecidas producidas por la lluvia. En ella se detecta que los espeleotemas siempre crecen por encima del nivel de inundación máximo (Figura 59). Además, en otras cuevas con circulación de agua como “A Trapa” o “Albarellos” los bioespeleotemas no se desarrollan, sino que se dan procesos de erosión.

Mediante microscopía electrónica de barrido se han observado las nanoesferas de ópalo, agregadas siguiendo estructuras periódicas (Figura 60) (ópalo cherry) y en diferentes niveles (Figura 61). Según la tasa de acreción de las nanoesferas descrita por Lynne (2015), este proceso necesitaría numerosos ciclos de 8 años para que se depositase cada una de las láminas. Sin embargo, en los casos estudiados en esta Tesis Doctoral se ha observado una relación directa entre los aportes del agua al sistema subterráneo y el crecimiento de los espeleotemas influenciado por las bacterias. Es difícil imaginar, por tanto, períodos tan prolongados en el crecimiento de los bioespeleotemas que más bien deberán ajustarse en cada caso, a las condiciones climáticas existentes en el exterior de las cavidades. Medios más áridos (Australia, Argentina), podrían justificar una velocidad de crecimiento más lenta al estar muy separados en el tiempo los períodos de pluviosidad, pero en climas templado húmedos como en Galicia, o en general en Europa, la velocidad de crecimiento sería mucho más rápida. Las bacterias harían crecer los espeleotemas de ópalo estudiados a una mayor velocidad (Kasama & Murakami, 2001), ya que la tasa de precipitación aumenta gracias al aumento de las tasas de nucleación por las EPS (Tourney & Ngwenya, 2014; Show *et al.*, 2015) las cuales juegan un papel importante en la silicificación (Tourney & Ngwenya, 2014); entendida como el proceso de deposición de las nanoesferas de ópalo sobre la superficie de las bacterias. El proceso por el que el ópalo A precipita, al contrario de lo indicado en algunas ocasiones en la bibliografía (Jones & Peng, 2015; Daza & Bustillo, 2014c; Miller *et al.*, 2014), no corresponde a un proceso de silicificación *sensu stricto* (reemplazamiento mineral molécula a molécula) dado que este biomineral precipita entre y sobre los microorganismos. Además, las EPS se ha visto que afectan en la distribución de las nanoesferas provocando una

distribución irregular de las mismas, ya que ligan componentes minerales o elementos del medio e impiden la agregación regular y rítmica descrita por Cortés Escobedo (2005) en condiciones de laboratorio. En las muestras estudiadas se pueden apreciar las nanoesferas que se van agregando sobre las bacterias (Figuras 62-64), hasta que finalmente forman una capa de recubrimiento continuo como se ha indicado anteriormente. En este sentido, las capas conformadas por el empaquetamiento de nanoesferas de SiO_2 , cuya superficie está formada por grupos silanol, permiten que las bacterias sigan desarrollándose durante la fase gel debido a que añaden a la molécula de SiO_2 agua de hidratación suficiente para sostener las comunidades bacterianas (Cortés Escobedo, 2005). De hecho, en las muestras estudiadas se han visto las bacterias que sobresalen del interior de la lámina de ópalo A (Figuras 65-66).

Estos EPS que interaccionan con las nanoesferas en el hidrogel de silicio, a menudo son fabricados por las células en situación de estrés (Teschke, 2005) y en el caso de las cuevas podría ser debido al estrés hídrico al que se someten cuando cesan los aportes de agua. Estas EPS, además, se sabe que tienen afinidad por ciertos metales pesados como algunos que han sido detectados en los análisis de MEB-EDX (Pb, Cd, Zn, Cr, Ni y Cu) (Urrutia & Beveridge, 1994). De manera que serán interceptados por las EPS de la superficie de las bacterias mientras sean transportados por el agua que corre por la superficie de la roca, estableciéndose puentes catiónicos con aniones de silicatos que posteriormente harán precipitar la sílice biogénica.

Una vez que se ha formado el ópalo A, la presencia de microorganismos en los biofilms permite una mayor disponibilidad del silicio, puesto que este se solubilizará a una mayor velocidad que el del cuarzo de la roca original (Figura 21). Los microorganismos, y sobre todo las bacterias, tienen una gran avidez por el Si, lo que explica que en las capas de ópalo amorfo (Opal-A) aparecen las mayores concentraciones de crecimiento de bacterias (Figuras 67-78) (Jones & Peng, 2015), apreciándose, en algunos casos, sus huellas (Figuras 79-81). Estas biofirmas también han sido observadas por otros autores en muestras de espeleotemas en tubos volcánicos (Miller *et al.*, 2014), en precipitados de ópalo A laminados (Jones & Peng, 2015) o en depósitos con crecimiento estromatolítico formados en aguas termales (Krumbein & Werner, 1983).

5.2.5. Etapa 4: Crecimiento de microcristales

El hidrogel de silicio constituye un medio favorable para la formación de microcristales de baja energía de cristalización. Es utilizado en el laboratorio para la formación de

cristales muy puros (triquitos) a partir de sustancias disueltas en el agua a muy baja concentración (Vidal Romaní, 1985). En los espeleotemas, los microcristales (el equivalente de los triquitos) se producen al comienzo de la época seca que culmina con la consolidación del hidrogel de silicio como ópalo amorfo (Vidal Romaní *et al.* 2003; Ziegenbalg *et al.*, 2011) y la formación de maclas de microcristales. Algunos autores entienden que estos microcristales se forman por acción bacteriana, es el caso de los cristales de calcita (Arp *et al.*, 1999; Baskar *et al.*, 2006; Portillo *et al.*, 2009; Legatzki *et al.*, 2011; Baskar *et al.*, 2014; Riquelme *et al.*, 2015b) (Figura 82). Sin embargo, en este caso, las bacterias a lo sumo podrían influir en la precipitación de estos compuestos, mediante la excreción de ácidos orgánicos que cambian el pH y otras condiciones del medio.

Esta etapa es la última del ciclo y se produce tanto en el seno del bioespeleotema, donde se forman cristales de morfologías variadas como en el extremo del mismo donde abundan las maclas de yeso (Figura 83-87). Las maclas de yeso que se forman a partir del hidrogel de silicio de la última gota que queda en el extremo del espeleotema, resultan en una forma esférica formándose una lepisfera o drusa en los de techo, y en el seno de los espeleotemas de suelo tiene forma oblonga achatada (Twidale & Vidal Romaní, 2005). En otros casos (Twidale & Vidal Romaní, 2005). La formación de los microcristales de yeso también se adapta a pequeños poros del espeleotema, dando cristales aciculares o también microcristales prismáticos muy idiomorfos en el caso de poros más estrechos (Twidale & Vidal Romaní, 2005). La morfología de los microcristales estará en todos los casos determinada por la morfología de la gota de agua en donde se produce el crecimiento debido a la sobresaturación por evaporación (Twidale & Vidal Romaní 2005; Serafeimidis & Anagnostou, 2014). La evaporación del agua marca la última etapa de crecimiento del espeleotema asociada al final de los aportes de agua al sistema subterráneo, pasando de la cristalización de sulfatos de yeso a anhidrita. A continuación, cuando estos se reanudan, por ejemplo si vuelve a llover, lo primero que se producirá es la inundación del espeleotema que resultará en un recubrimiento por una capa de agua. El agua marca el reinicio de la actividad orgánica y en algunos casos se pueden observar nuevos crecimientos de bacterias sobre los cristales de yeso (Figuras 88-93) donde se ha formado una nueva capa de hidrogel de silicio (Figuras 94-97) que puede llegar a recubrirlos totalmente (Figura 98).

5.2.6. Crecimiento de tipo estromatolítico

La existencia de bioestructuras que han sido interpretadas (Vidal Romaní *et al.*, 2015) como microestromatolitos terrestres dentro de las cuevas estudiadas, se atribuye al crecimiento de bacterias y/o cianobacterias y algas cuando existe humedad. Éstas actúan de trampa de sedimentos y agua, atrapan y ligan precipitados químicos mediante aerotaxis o fototaxis (Bojanowski & Trivedi, 2015) y forman, lámina a lámina, estas estructuras biosedimentarias. El biofilm actúa como medio pasivo de acumulación de precipitados (Brake *et al.*, 2014), que se consolidan cuando la evaporación del agua detiene el proceso de desarrollo de los organismos y se produce la sobresaturación de silicio (Trollope, 1975).

En cuanto a su morfología, las bandas claro oscuras que presentan en su interior, al contrario de lo que indica Mata *et al.* (2012), no responden a respuestas fototácticas de las comunidades de filamentos cianobacterianos, debido a que se desarrollan en constante oscuridad dentro de la cueva. Por otro lado, tampoco se puede afirmar que esta distribución de bandas claroscuros sea debido a la presencia de bandas claras con microorganismos filamentosos y bandas oscuras con cocoides (Hofmann, 1975). En nuestro caso, las morfologías filamentosas y cocoides se entremezclan a lo largo de toda la superficie en la misma lámina de crecimiento. Este crecimiento se asemeja más a la explicación de Konhauser *et al.* (2001), donde el crecimiento microbiano depende de la disponibilidad del agua en las diferentes estaciones; lo que no deja de ser una obviedad pues ya nos hemos referido a la estrecha dependencia entre la humedad ambiental y el desarrollo de las comunidades bacterianas. En su defecto, las zonas de la base tienen colores claros debido al menor contenido en materia orgánica que aumenta hacia la punta donde presentan colores más oscuros, intercaladas con bandas claras que corresponden con fases de cementación por el ópalo A. Esta alternancia de bandas claroscuros superpuestas y que corresponden a texturas con una microfábrica con mayor tendencia abiogénica o biogénica (Frantz *et al.*, 2014), son resultado de cambios en la disponibilidad del agua, lo que influye en la microbiota y la química de las aguas, indicando que el crecimiento del estromatolito puede ocurrir bajo diferentes condiciones. Cuando ocurre la evaporación se concentran Si, Al, Na, Mg, O y C, y es cuando se producen los procesos de precipitación abiogénicos.

Las diferentes láminas superpuestas que los forman se corresponden con las variaciones en la actividad microbiana, que suele ser mayor en primavera y verano y menor en otoño e invierno, donde el crecimiento sería más lento y la silicificación menos intensa. Sin embargo, el ambiente de la cueva modifica este crecimiento dado

que está constantemente en oscuridad y el factor limitante para el crecimiento no es la luz, sino el agua. Cuando hay más agua que posibilite la vida de las bacterias (primavera y verano) las masas de aire caliente se condensan con mayor facilidad sobre la superficie rocosa fría y aportan la humedad necesaria para que se produzca el crecimiento de estos estromatolitos. Por esto, los factores que rigen su crecimiento son la tasa de evaporación, la condensación del agua y a la humedad de la cueva, de la misma forma que el crecimiento de los estromatolitos verdaderos se produce en lagos susceptibles a los cambios en el nivel del agua.

Estos estromatolitos se desarrollan en los suelos de las cavidades contra gravedad y por tanto no se forman por goteo como se podría pensar al equiparlos con estalagmitas.

5.3. MICROORGANISMOS QUE FORMAN LOS BIOESPELEOTEMAS

5.3.1. Análisis de los datos de secuencia

En los espeleotemas estudiados en esta Tesis, el origen biológico de los bioespeleotemas se confirma, por un lado, mediante su estudio al MEB donde se aprecia un recubrimiento casi continuo de microorganismos, y por tecnologías de secuenciación masiva que identifican taxonómicamente la presencia de hasta 350 géneros diferentes de bacterias y arqueas. Muchas no identificadas en estos medios hasta la fecha. Estos resultados, obtenidos utilizando técnicas moleculares de última generación (*metabarcoding*) (Vidal Romani *et al.*, 2015) permitieron descartar la idea errónea de que los medios subterráneos, especialmente los desarrollados en cuevas de rocas magmáticas presentaban muy poca biodiversidad. La aplicación de esta técnica de biología molecular para la identificación de los microorganismos se dio gracias a la exitosa aplicación, contra todo pronóstico, de protocolos para la extracción de ADN (Barton *et al.*, 2006) en estas muestras de origen geológico con bajos niveles de biomasa y con altos contenidos de calcio, manganeso o silicatos. Además, el análisis de los datos bioinformáticos con dos métodos bioinformáticos (*Greengenes* y *SILVAngs*) ha permitido corroborar que las secuencias obtenidas pertenecen a grupos bien identificados, así como también ha permitido contrastar estos dos métodos para el análisis de los datos. A continuación se discuten las diferencias y similitudes entre ambos métodos.

5.3.2. Contraste entre los diferentes métodos bioinformáticos aplicados

Se han analizado los datos con diferentes métodos bioinformáticos (*Greengenes* y Qiime 1.7.0 (Caporaso *et al.*, 2010)) detectándose solo pequeñas diferencias. En los análisis efectuados con *Greengenes*, se ha observado una gran biodiversidad en cuanto a las bacterias presentes, observando un total de 29 filos de bacterias y 2 de Arqueas, apareciendo una media de 18 filos en cada muestra. Sin embargo, los análisis efectuados con SILVAngs 1.2 (Quast *et al.*, 2013) y Arb SVN, presentan un total de 31 filos diferentes de bacterias. Sin embargo, las diferencias entre la distribución de abundancias de los diferentes filos a lo largo de las diferentes muestras analizadas con *Greengenes* y con SILVAngs 1.2 resultaron muy similares. Excepto en A1 (la más exterior), donde con *Greengenes* se ha detectado una mayor abundancia de *Proteobacteria* y con SILVAngs 1.2 se ha detectado una presencia a partes casi iguales de este filo junto con *Actinobacteria* y *Cyanobacteria*. Otras diferencias destacables han sido que en algunas muestras según *Greengenes* muestran presencia del filo WPS-2 mientras que esos resultados analizados bajo SILVAngs 1.2 corresponden al filo WD272 (Figura 99), ya que ambos filos no son reconocidos por ambas bases de datos. Esto es debido a que corresponden a nuevos linajes sin afinidad con algún filo bacteriano conocido hasta el momento (Youssef *et al.*, 2015).

En ambos casos la determinación se ha realizado hasta nivel de género, sin embargo, algunas secuencias sólo se han identificado hasta taxones más amplios dada su imposibilidad de llegar a nivel de género, sobre todo en bacterias recientemente catalogadas en nuevos filos.

Finalmente, cabe destacar que, pese a que existe un problema de estandarización en cuanto a la forma de presentar los resultados según con qué base de datos se compare, los datos genéticos obtenidos (Youssef *et al.*, 2015) confirman que la biodiversidad bacteriana a grandes rasgos es muy similar, y las conclusiones respecto a la biodiversidad bacteriana encontrada como se detalla a continuación son las mismas.

5.3.3. Diversidad bacteriana en las cuevas estudiadas frente a la literatura

Los filos de bacterias mayormente encontrados en las cuevas estudiadas en esta tesis son: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*,

Gemmatimonadetes, *Nitrospirae*, *Actinobacteria* y candidatos de las divisiones (OP3, GN08, y SBR1093). Y en menor medida: *Gemmatimonadetes*, *Nitrosomonadales*, *Oceanospirillales*, y *Rubrobacterales*. Estos resultados coinciden en la mayoría de los estudios realizados en cuevas de caliza (Tabla 1 - capítulo 2. Antecedentes) (Holmes *et al.*, 2001; Chelius & Moore, 2004; Barton *et al.*, 2007; Meisinger *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008; Portillo *et al.*, 2008, 2009; Chen *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2010a y b; Shabarova & Pernthaler, 2010; Baskar *et al.*, 2012; Rusznyák *et al.*, 2012; Ortiz *et al.*, 2014; Kieraite-Aleksandrova *et al.*, 2015), de tubos volcánicos (Northup *et al.*, 2011; Hathaway *et al.*, 2014; Riquelme *et al.*, 2015a) y de carbonatos (Gray & Engel, 2013).

Se puede afirmar que los filos más ubicuamente encontrados tanto en cuevas de rocas ígneas como de rocas sedimentarias son: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Tabla 1 - capítulo 2. Antecedentes) (Tabla 1). Lo que coincide con lo indicado por Northup *et al.* (2013), aunque estos autores incluyen también los filos *Chloroflexi*, *Nitrospirae* y *Verrucomicrobia* y excluyen a *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. También es importante señalar que los filos *Actinobacteria* y *Cyanobacteria*, presentan mayor abundancia en cuevas de rocas ígneas. Esto podría sugerir que estas cuevas son el mayor nicho o reservorio donde crecen estos filos (Northup *et al.*, 2011).

Según estos resultados se confirma que el factor de mayor influencia en la abundancia bacteriana en sedimentos son, entre otros la litología (Epure *et al.*, 2017). Un hecho relevante respecto a esto es que en las cuevas estudiadas en esta tesis, destaca la abundancia del filo *Chlamydiae*, frente a la casi inexistente presencia en cuevas de carbonatos (Tabla 1).

Además, otra diferencia principal es la presencia exclusiva o casi exclusiva en rocas de rocas ígneas de ciertos filos nuevos y no cultivables como son *AD3*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *FBP*, *FCPU426*, *GAL15*, *Gammaproteobacteria*, *GN02*, *OP3*, *Tenericutes*, *TM6*, *WPS-2*, *TM7*, *Thermi*, *TA06*, *Spirochaetes*, *OD1*, *Ktedonobacteria*, *GN01* y *Fusobacteria* (Tabla 1- capítulo 3. Antecedentes y Tabla 2). Por otro lado, los filos *BRC1*, *Gemmatimonadetes*, *OP11*, *SR1* y *WS3* son sólo encontrados en cuevas de caliza (Kieraite-Aleksandrova *et al.*, 2015). Según esto existen mayor número de filos exclusivos en cuevas de rocas magmáticas que en calizas (Tabla 2). Siendo esto muy representativo debido a que la mayor parte de los trabajos están realizados en rocas de cuevas calizas y pocos en

magmáticas, lo que indica que podrían existir nuevas bacterias si se siguen estudiando estos ambientes con este tipo de técnicas.

En los estudios microbiológicos realizados en cuevas, la media de filos identificados es 7 y la mayor parte de los estudios realizados se han hecho en cuevas de calizas. Sin embargo, mientras que en la bibliografía se han citado alrededor de 40 filos diferentes de bacterias en las cuevas de rocas sedimentarias de carbonatos (Tabla 1- capítulo 2. Antecedentes), en las cuevas de rocas ígneas se han encontrado un total de 38 filos diferentes. Aun así, habría que hacer constar que los trabajos en rocas ígneas (volcánicas y magmáticas) son más recientes y menos numerosos, (tenemos referencia de tan solo 11 trabajos frente a 44 que han estudiado la microbiota de cuevas de rocas carbonatadas: areniscas, calizas y dolomías). Como se ha indicado anteriormente, los trabajos que hasta el momento han estudiado la biodiversidad bacteriana de forma exhaustiva son los de Vidal Romaní *et al.* (2015) en cuevas graníticas y Kieraite-Aleksandrova (2015) en cuevas calizas. En ambos tipos de cuevas los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria* son los que se encuentran en mayor abundancia, pese a tratarse de una litología diferente. Sin embargo, la existencia de hasta 29 filos diferentes en Vidal Romaní *et al.* (2015) supera de los 24 encontrados por los autores en (Kieraite-Aleksandrova *et al.*, 2015) (Tabla 1 - capítulo 2. Antecedentes) (Tabla 2). Esta diferencia podría venir determinada por el tipo de cueva, que en nuestro caso es más abierta y se desarrolla en rocas con silicio que favorecen el desarrollo de la vida (Service, 2016); como muestra la existencia de 350 géneros identificados en nuestro caso (Vidal Romaní *et al.*, 2015), frente a los 259 por Kieraite-Aleksandrova *et al.* (2015). Adicionalmente, el estudio realizado por Vidal Romaní *et al.* (2015) contempla el grupo *Arquea*, lo que la mayor parte de los trabajos no se hace, a pesar de tratarse un grupo de interés para estudiar el origen de la vida por tratarse de los seres vivos más antiguos que existen en la tierra.

Para explicar qué significa esta diversidad bacteriana en las cuevas estudiadas, a continuación se detalla la clasificación taxonómica de las mismas, y cuáles son las características que les permiten resistir a las condiciones de los sistemas subterráneos estudiados.

5.3.4. Clasificación taxonómica

En este trabajo de tesis no se han considerado los diferentes grupos definidos por Pavan (1958) basados en el sistema Schiner-Racovitza, ya que esto requeriría realizar un estudio experimental de recuento de organismos durante tres o más años para

poder detectar posibles variaciones en la composición de la comunidad. Aun así, se ha realizado un estudio de diferentes cavidades a lo largo del tiempo, lo que ha permitido obtener resultados muy completos en cuanto a la biodiversidad y su relación con el ambiente cavernícola. En este estudio consideramos a los organismos detectados, troglófilos (bacterias, hongos, amebas testáceas, algas diatomeas y artrópodos) ya que, no se puede afirmar que existan las características troglomorfas por tratarse de cuevas abiertas e influidas por el ambiente exterior.

Los organismos que frecuentan la cueva, sea cual sea su relación con la misma y, sobre todo, los que se sitúan sobre la superficie rocosa, son de especial importancia para la formación de los depósitos estudiados. Estos depósitos actúan como trampas o son considerados el troglotopo sobre el que se desarrollan los organismos, los cuales presentan varios niveles de dependencia o asociación con estos depósitos.

5.3.4.1. Bacterias

5.3.4.1.1. Actinobacterias

El filo tiene un linaje de 2.7 millones de años y podría haber sido uno de los primeros filos que habrían invadido los continentes, en los primeros estadios de evolución de la Tierra, utilizando las cuevas como medio de transición entre los ambientes marino y terrestre. Son un filo morfológicamente diverso de bacterias Gram positivas que aparecen en ambientes, tanto terrestres como acuáticos en todo el Mundo y, sobre todo en ambientes de suelos y rocosos. Por esto, la ocurrencia de actinobacterias como el grupo más abundante, es usual en cualquier cueva subterránea (Rajput *et al.*, 2014) estudiada en la bibliografía; sobre todo, teniendo en cuenta que la mayor parte de la humedad de la cueva procede del agua de infiltración que arrastra este tipo de organismos desde la superficie. Su abundancia se debe a la habilidad para producir artrosporas de resistencia y una lámina de péptidoglicano o EPS en su superficie. Estas características mejoran su capacidad dispersiva y aumentan la resistencia en estado latente, cuando son sometidas a las condiciones de estrés (Cockell *et al.*, 2013) típicas de cuevas, donde el agua líquida es habitualmente transitoria y la materia orgánica baja. En cuanto las condiciones cambian y son idóneas, estos organismos experimentan un crecimiento masivo, sobre todo después de las lluvias, esto eleva la producción de compuestos de geosmina (*Streptomyces*) lo que da un olor a tierra mojada, olor característico de las cuevas. El filo *Actinobacteria* es muy conocido en cuevas y suelos, sobre todo el género *Actinobacteridae* y dentro de este, las subclases *Actinobacteridae* y *Acidimicrobidae* (Zhi *et al.*, 2009). Muchas de estas bacterias son especies recientemente descritas y otras acidófilas (*Acidiphilium*,

Conexibacteraceae), lo que es de esperar debido a los pocos estudios existentes en este tipo de medios y a la condición félsica de las rocas graníticas. También se han encontrado especies de la familia *Pseudonocardiaceae*, un tipo de Actinobacterias que parasitan artrópodos, esto se justifica por la gran cantidad de estos organismos sobre los espeleotemas.

5.3.4.1.2. Cianobacterias

Constituye un gran grupo de bacterias fotótrofas muy heterogéneo ecológica y morfológicamente. Son tanto unicelulares como filamentosas y su tamaño celular oscila desde 0,5 μm de diámetro a más de 100 μm . Estas aparecen a lo largo de toda la cueva, aunque presentan mayor abundancia en las zonas de entrada, con más luminosidad para realizar la fotosíntesis y porque esta luz (Coombes *et al.*, 2015), influye en la distribución de los organismos determinando la ecología de las cuevas y sus gradientes de biomasa, los cuales descienden hacia el interior, como el oxígeno, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.

Estas bacterias filamentosas tienen cierto grado de diferenciación celular que permite la fijación de nitrógeno con fotosíntesis oxigénica en ciertos ambientes oligotróficos, como son los ambientes cavernícolas a estudio. Además, comparten con muchas arqueobacterias la habilidad de ser sulforeductoras de azufre elemental para llevar a cabo la respiración anaeróbica en condiciones de oscuridad. Este tipo de metabolismos es lo que les hace sobrevivir en las profundidades de las cuevas. Entre este grupo de procariotas fotosintéticos también se encuentran fotótrofos anaeróbicos (usan el sulfuro de hidrógeno y tiosulfato, así como hidrógeno molecular como alternativos donadores de electrones), fotoheterótrofos, quimioheterótrofos anaeróbicos y aeróbicos fijadores de dinitrógeno.

El estudio de estas bacterias en las cuevas puede ayudarnos a dilucidar cómo fueron las primeras formas de vida terrestres, ya que estos organismos fueron los primeros fotótrofos productores de oxígeno sobre la Tierra y los responsables de la transformación de una atmósfera terrestre anóxica en una atmósfera óxica. Además, este grupo se sabe que contribuye a la biometeorización, incrementando el pH en rocas basálticas mucho más que el proceso análogo abiótico (Olsson-Francis *et al.*, 2012). Es por esto que el estudio de estos microorganismos en cuevas nos ayuda a comprender las diferentes estrategias metabólicas que evolutivamente han adquirido las bacterias para sobrevivir las condiciones inhóspitas de estos microambientes.

5.3.4.1.3. Proteobacterias

Este es, junto con las actinobacterias, el filo con mayor presencia en las muestras estudiadas. Esto es debido a que es, con gran diferencia, el mayor grupo (filogenéticamente, se dividen en cinco clases: Alfaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias y Epsilonproteobacterias) y metabólicamente más diverso de todas las bacterias (quimiolitotrofas, quimioorganotrofas y fototrofas); lo que hace que puedan adaptarse a cualquier situación que se de en las cuevas y sobrevivir a los cambios ambientales. De entre los géneros encontrados, *Paracoccus*, es el representante típico de las bacterias oxidantes del hidrógeno. La característica especial de este grupo es que pueden crecer con H_2 como único donante de electrones y con O_2 como aceptor de electrones, utilizando como metabolismo energético la reacción «knallgas»; es decir, la reducción de O_2 con H_2 . Casi todas las bacterias del hidrógeno son quimiolitotrofos facultativos, lo que significa que también pueden crecer de modo quimioorganotrofo utilizando compuestos orgánicos como fuente de energía; o sea, pueden alternar entre sus modos metabólicos según lo requieran las condiciones reinantes en sus hábitats. Cuando hay aporte de materia orgánica pueden cambiar su metabolismo y crecer sin tener que competir por el sustrato mineral con los quimiolitotrofos estrictos.

La razón por la que los microorganismos presentes en estos ambientes tan hostiles son capaces de sobrevivir, es gracias a sus metabolismos quimioorganotrofos, que metabolizan el carbono orgánico depositado dentro de los sedimentos, y también debido a los quimiolitotrofos (entre ellos las bacterias reductoras de sulfato, microorganismos metanógenos y acetógenos), que probablemente son los que dominan la vida en las cuevas. Si los metanógenos de las profundidades están activos, es probable que los otros grupos fisiológicos también lo estén, porque en un ambiente donde escasea la materia orgánica, el metabolismo común que une a estos organismos es el hidrógeno molecular (H_2). El H_2 es un producto corriente del catabolismo fermentativo de la materia orgánica y en este medio, también podría originarse aparentemente por la interacción química del agua con los minerales de hierro en las rocas. Si es verdad que estos organismos sobreviven estrictamente de un modo geoquímico y no dependen de los materiales orgánicos generados fototróficamente, es debido a que su aceptor de electrones (CO_2 en los metanógenos y los acetógenos, y SO_4^{2-} en las bacterias reductoras de sulfato) y donador de electrones (H_2) proceden de materiales inorgánicos, en este caso de los minerales de las rocas. Aunque no hay mucha materia orgánica, existen aportes del exterior mediante el agua y, por lo tanto, la fermentación también podría ser fuente de parte del H_2 utilizado por

los quimiolitótrofos de la superficie, como ocurre en las comunidades de la superficie anóxica. La importancia ecológica de estos ecosistemas microbianos basados en el H_2 en la subsuperficie profunda sugiere que, dado que existe la sospecha de que la cantidad total de procariotas en la subsuperficie de la Tierra es muy grande, estos microorganismos soterrados podrían ser los principales catalizadores del ciclo del carbono en la Tierra.

Otras de las bacterias encontradas en las muestras pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* que presentan una tolerancia elevada a entornos ácidos; la mayoría de las cepas pueden crecer sin problemas a valores de pH inferiores a 5, por esto las cuevas de granitos, de naturaleza félsica, son un medio favorable para ellas.

En las muestras estudiadas, también, ha sido encontrado el género *Photobacterium* y algunas bacterias de la familia *Vibrionaceae*. Estas bacterias presentan bioluminiscencia, *Shewanella* es un ejemplo presente en las cuevas estudiadas (Castelo da Furna, Portugal) y esto podría ser la consecuencia del reflejo iridiscente que, en ocasiones, muestran espeleotemas.

Otras bacterias presentes en las muestras y que también han sido reconocidas a través de los análisis al MEB son las Mixobacterias, que forman estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructificantes y varían desde simples masas globulares de mixosporas en una mucosidad ligera, hasta formas complejas con un cuerpo fructificante con pared y con tallo (Figuras 100-104).

Sin embargo, este grupo es un gran desconocido ya que la mayoría están todavía por cultivar y tan sólo se conocen por las secuencias de sus genes del 16S RNA obtenidas a partir de muestras de sedimentos. Se sabe que abundan en las cuevas estudiadas, en suelos, hábitats de agua dulce y en manantiales termales, probablemente debido a su diversidad metabólica que parece asignarle una gran relevancia ecológica. Finalmente, el encontrar un gran reservorio de este tipo de bacterias es muy interesante desde el punto de vista médico, agrícola o industrial, ya que incluyen la mayoría de las bacterias conocidas con importancia en estos sectores.

5.3.4.1.4. Otros filos bacterianos

Entre otros géneros interesantes encontrados en las muestras figura *Mycoplasma*. Estos son procariotas inusuales en tanto que carecen de paredes celulares y se encuentran entre los organismos más pequeños capaces de crecimiento autónomo.

También presentan un interés evolutivo especial debido a su sencilla estructura celular y a sus pequeños genomas. Son organismos que probablemente tuvieron pared celular pero dejaron de necesitarla debido a sus hábitats tan especiales. Los micoplasmas son parásitos y habitan en hospedadores animales y vegetales, por lo cual su presencia en espeleotemas indica la existencia de animales, organismos que han sido parasitados por ellos.

5.3.4.2. Hongos

Su estudio en cuevas no turísticas tiene especial importancia como control negativo o “blanco” de la contaminación antropogénica que se da en las cuevas turísticas donde existen numerosos estudios de estos organismos. Esto permitiría la realización de una comparativa entre el verdadero aporte antropogénico de microorganismos que se da en las cuevas y la microbiota fúngica natural propia de los ambientes cavernícolas. El motivo por el que los hongos en las cuevas han sido ampliamente estudiados es porque tienen un papel importante en el biodeterioro del sustrato rocoso. Éstos excretan ácidos (acético, láctico y butírico) y pigmentos que contaminan las superficies rocosas, deteriorando las cuevas de interés turístico. Sin embargo su diversidad y distribución biogeográfica está poco estudiada (Tedesco *et al.*, 2014) y un estudio más a fondo de cuevas visitadas y naturales sería interesante desde el punto de vista ecológico. La relevancia en las cuevas estudiadas en esta tesis es conocer en qué medida sus ácidos contribuyen a la formación de los depósitos que estudiamos; de hecho, autores ya han acuñado como “speleomycology” al proceso mediante el cual los hongos participan del crecimiento de bioespeleotemas (Pusz, 2014).

Por lo que se refiere a los hongos y en contraste con su amplia representación en los suelos no tienen apenas presencia en las cuevas. Esto es debido a que se alimentan de materia orgánica y esta es muy escasa en las cuevas.

5.3.4.3. Amebas testáceas

Las amebas testáceas son parte de la troglofauna habitual de las cavidades desarrolladas en rocas ígneas (plutónicas y volcánicas) donde, la persistencia de humedad, la disponibilidad de silicio y materia orgánica permiten a estos protozoos desarrollar todo su ciclo biológico. Están involucrados en los procesos litogénicos y de depósito de los espeleotemas (Cañaveras *et al.*, 2006; Mulec, 2008); y su aparición se ha visto relacionada con las diferentes zonas de la cueva y con la presencia de los organismos que les sirven de alimento (algas, hongos y bacterias) (Walochnik y Mulec,

2009). Forman parte de la comunidad microbiana típica siendo un link entre las bacterias y los metazoos pequeños, jugando un papel muy importante en la cadena alimentaria.

En cuanto a su diversidad, en las muestras estudiadas abundan las que tienen idiosomas, gracias al silicio disponible para fabricar sus testas. Las condiciones ambientales y, sobre todo la disponibilidad de agua en la cueva, afectan a su biodiversidad (Bobrov *et al.*, 2004). Por esto, en las muestras estudiadas de las regiones con menor disponibilidad de agua, que ponga el silicio en disolución (Australia), se ha encontrado menor biodiversidad que en regiones con mayor aporte de agua, que incremente la meteorización de la roca y solubilidad de este elemento para la formación de sus testas. Sin embargo, otras (*Amphitrema wrightianum*) las fabrican con clastos que están a su disposición en la matriz detrítica y que fijan gracias a la secreción de un material orgánico o con minerales como cuarzo (*Physochila griseola*) (Ogden, 1979). En ocasiones también se aprecian testas mixtas donde figuran idiosomas con exosomas. Cabe la posibilidad de que estas comiencen a fabricar la testa con placas de silicio y en el momento en que este escasea, recurren a completar la testa con partículas minerales o restos de organismos que se encuentran en su entorno más próximo. *Physochila* (*Nebela*) *griseola* o *Diffugia minutissima*, están formadas por idiosomas circulares de silicio y frústulos de diatomeas, debido a que ambos organismos (amebas y diatomeas) compiten por el silicio disponible para formar sus envueltas protectoras (Figuras 105-106).

Los géneros habituales de amebas testáceas en las cuevas de rocas ígneas corresponden a los géneros que aprovechan ese silicio para fabricar sus testas: *Trinema*, *Euglypha*, *Corythion* y *Centropyxis*, con la particularidad de presentar morfologías aplanadas y ejemplares de pequeño tamaño como han señalado previamente Walochnik y Mulec (2009), quizás por las condiciones restrictivas que existen en estos medios. Estos géneros coinciden con los encontrados en ambientes edáficos por Lousier (1974, 1982) y la mayor diversidad existe en los géneros *Centropyxis* y *Euglypha*, al igual que lo previamente señalado por (Mazei *et al.*, 2012).

En el espeleotema las amebas se desarrollan y viven sobre una pátina de agua transitoria, por lo que es frecuente observar agrupaciones de amebas o individuos aislados asociadas a los microporos de los espeleotemas, que es donde persiste la humedad por más tiempo. La misma existencia de las amebas parece confirmar que la energía del micromedio sedimentario es muy baja, pues de otro modo la estabilidad de la testa se vería comprometida. Probablemente por esa razón los organismos que

colonizan estos medios y, en este caso las amebas testáceas, desarrollan estrategias para sobrevivir a la sequía y conservar la humedad. Estas amebas crean quistes que, esencialmente es la secreción de un tapón proteínico interno cerca del pseudostoma y la retirada de la célula a la parte posterior de la testa, lo cual les permite defenderse de otros organismos predadores y conservar la humedad (Figura 107).

Las testas de amebas fueron detectadas mediante MEB sobre la superficie de los espeleotemas en diferentes estados de conservación: Intactas (Figuras 108-109), en distintas fases de destrucción de la testa (Figura 110) o con esta totalmente dismantelada en sus idiosomas (Figuras 111-115). Se han visto individuos aislados o en grupos de varios especímenes, a veces de distinto tamaño, y también asociadas físicamente (Figura 116) o con otros microorganismos y como cianobacterias posiblemente simbióticas (Figura 117). El aspecto de estos protozoos depende del tiempo transcurrido desde la desaparición del agua de la cueva, obviamente conservándose en mejor estado en los casos en que la muestra fue tomada durante la etapa húmeda. Cuando el espeleotema es recogido en la época seca, es habitual que las testas aparezcan incluidas en el material granular polimineral que forma el cuerpo del espeleotema o también parcialmente cementadas por el ópalo A precipitado.

Finalmente, y aunque el trabajo se realizó sobre una muestra geográficamente muy diversa (con claro predominio de las muestras de la Península Ibérica y Suecia) (Gráfico 2 - capítulo 4. Resultados) existe una gran homogeneidad en la distribución de las amebas (Gráficos 3-19 - capítulo 4. Resultados). Esto indica que, a pesar de las diferentes condiciones bioclimáticas que se dan en el entorno exterior de la cueva, dentro de las mismas, existe un ambiente estable que explica esta similitud de las especies identificadas.

5.3.4.4. Algas diatomeas

Las diatomeas son organismos fotosintéticos, es decir, productores primarios y su distribución en los espeleotemas está influenciada por determinados factores espaciales (presencia de agua y luz), temporales (estaciones climáticas) y disponibilidad de silicio en el agua, por lo que son altamente sensibles a los cambios en la naturaleza química del medio, en particular a la concentración de nutrientes (P, N, Si) y a la presencia de contaminantes. Esto les hace ser reflejo de las condiciones de los ambientes en las que viven, y dado que poseen una gran facilidad de conservación, permiten la obtención de resultados comparables y reproducibles a largo plazo; lo que hace muy interesante su presencia en los espeleotemas

permitiendo realizar estudios paleobiológicos de las cuevas tanto actuales como pasados. Además, son importantes indicadores ecológicos gracias a su sensibilidad a cambios en la salinidad, temperatura, pH y contaminación, lo que también los hace excelentes indicadores paleoambientales (Ivarsson *et al.*, 2013a y b).

Respecto al ciclo vital, las diatomeas presentan ciclos vitales cortos y homogéneos y, al ser microorganismos unicelulares, se reproducen con rapidez en respuesta inmediata a eventuales cambios en condiciones del medio. Esta característica la presentan la mayoría de los organismos que viven sobre los espeleotemas. Debido a esto, la composición de la comunidad de diatomeas en cada punto, representa la calidad biológica del agua durante determinados y cortos periodos de tiempo, y no sólo la condición puntual que reflejaría un análisis físico-químico. Incluso, su estudio proporciona valores temporales pues, al contrario que otros organismos, las diatomeas, y más específicamente los frústulos, sobre los que se basa su taxonomía son prácticamente inalterables en el tiempo, y se pueden recuperar en estado fósil o subfósil de espeleotemas de diferentes épocas; lo que permite inferir el estado del agua en el pasado para la reconstrucción de paleoambientes a escala geológica.

En estos medios los tipos de diatomeas que se encuentran son las llamadas epífitas, que se adhieren a las superficies rocosas y viven expuestas al aire (aerofitas) gracias a los aportes de humedad ambiental que se condensa sobre la superficie de la roca. Debido a su directa relación con la humedad del sustrato, disminuyen su riqueza según lo hace la humedad, encontrando menos especies en ambientes secos, algo que también ocurre con las amebas testáceas. Sin embargo, el tipo de sustrato es el factor que mayor influencia tendrá en la diversidad de las comunidades de diatomeas (Ivarsson *et al.*, 2013a), ya que es esencial un alto contenido en silicio en el medio.

En la cueva, el lugar donde se sitúan es en paredes, suelos y techos de la entrada o en zonas abiertas donde llega la luz. Las diatomeas aparecen aisladas, en colonias (Figuras 118-119), o incluso también se han observado pequeñas poblaciones, llegando a formar biofilms (Falasco *et al.*, 2014) (Figuras 120-121). A veces incluso coexisten varias especies de tamaños muy diferentes (Figura 122). En algunas de las muestras (A Cunchosa) estudiadas en esta Tesis se han encontrado recubrimientos continuos de diatomeas, un hecho ya descrito por otros autores (Lundberg *et al.* 2010) para las paredes de cuevas artificiales. Sin embargo (Lundberg *et al.* 2010), en su trabajo hacen alusión a que estas crecen sobre la roca sin alterar y en esta tesis se ha

podido confirmar que la superficie sobre la que se desarrollan está cubierta de hidrogel de silicio y no se trata de roca.

Estos organismos han sido identificados de forma poco precisa y general, debido a que su estudio al MEB sólo nos permite visualizarlas puntualmente en la posición en la que han quedado sus frústulos sobre el espeleotema; lo que provoca que, en la mayoría de los casos, no se puedan observar sus características taxonómicas. Sin embargo, la gran abundancia y diversidad taxonómica de diatomeas encontradas es uno de los principales resultados obtenidos a partir de los muestreos efectuados hasta hoy en este tipo de cuevas, existiendo revisiones anteriores de las diatomeas en cuevas que muestran una menor diversidad (Falasco *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos muestran un promedio de 12 géneros reconocibles y casi otro tanto de taxones con diferente morfología, que no han podido ser clasificados en ningún género en concreto por carecer de ejemplares suficientes para su estudio. Esto representa una riqueza comparativamente mayor que la hallada en estudios realizados en otros tipos de cuevas (Falasco *et al.*, 2014). Lo que es debido a la mayor disponibilidad de silicio en sistemas subterráneos desarrollados en rocas silicatadas como es el caso del granito.

Además, en el ámbito biogeográfico, este estudio ha permitido la detección y comparación, por primera vez de la presencia de diatomeas sobre espeleotemas de cuevas de rocas graníticas en todo el Mundo y en regiones climatológicamente muy diferentes. Además, ha permitido la detección de algunas especies consideradas marinas en entornos de aguas saladas continentales debido a que corresponden a zonas endorreicas de los desiertos interiores de Australia.

Finalmente, este estudio, en contraposición a los estudios habituales de diatomeas en cuevas, se ha realizado en cuevas en las que no ha habido apenas modificación humana, pues las cuevas más exploradas suelen ser turísticas. En estas, las comunidades de diatomeas crecen debido a la luz artificial y por ello reciben el nombre de “lampenflora” (Falasco *et al.*, 2014). Su interés está en relación a uno de los mayores retos de la conservación de las cuevas turísticas (Piano *et al.*, 2015), ya que los organismos causan daños físicos, químicos y estéticos a los espeleotemas o pinturas rupestres.

5.3.4.5. Artrópodos (Filo *Arthropoda*)

5.3.4.5.1. Hexápodos (Subfilo *Hexapoda*)

Estudiar este grupo en las cuevas es interesante dado que la mayor parte de los artrópodos que abundan en las muestras, se ha visto que pertenecen a un grupo de taxones poco evolucionados y antiguos llamados “fósiles vivientes”, que son los colémbolos (Springtails, orden *Collembola*) y los tisanuros (Silverfish, orden *Thysanura*) junto con otros organismos pertenecientes a otros subfilos (orden *Isopoda*). Estos microartrópodos son típicos de medios donde existe escasez de nutrientes y por eso han sobrevivido a lo largo de los años en las cuevas a estudio.

A continuación se describen los grupos típicos que aparecen en los espeleotemas estudiados:

5.3.4.5.1.1. Colémbolos (Orden *Collembola*)

Son habitantes típicos del suelo y por esto también se encuentran en gran abundancia en las cuevas, llegando a ellas a través de las grietas de la roca ayudados por el agua de infiltración. Son, junto con los ácaros oribátidos (también presentes en las muestras de cuevas estudiadas), los microartrópodos dominantes en el suelo, encontrándose tanto en las zonas profundas como superficiales. También son habitantes típicos del guano junto con dípteros y sus larvas, ácaros, y algunos coleópteros. Los pequeños depósitos de guano y su fauna guanobia atraen a cavernícolas principalmente predadores y por ello constituyen otra fuente de alimento en la trama del medio hipógeo. Además, las comunidades colémbolos responden con gran rapidez a los cambios ambientales de temperatura y humedad (Liu *et al.*, 2017) que ocurren en las cuevas; estando más asociados a las épocas y ambientes más húmedos (A Cunchosa). De hecho, los grupos que más responden a estos cambios (*Entomobrya*), son los más abundantes en las cuevas estudiadas, por lo que se presupone que son los grupos más capaces de responder a cambios de temperatura y humedad y sobrevivir en el tiempo.

Su presencia se ha detectado a partir de restos de exuvias (cutícula, cubierta exterior o exoesqueleto), abandonada por estos tras la muda sobre la superficie de los depósitos y lo que dificulta la determinación de los ejemplares a partir de sus características taxonómicas. Para realizar un estudio a fondo sobre estos organismos en estos ambientes sería necesario realizar una recolecta directa de especímenes, que es la metodología habitualmente utilizada en las cuevas de rocas sedimentarias,

donde usualmente son estudiados (Jordana & Baquero, 2005; Sendra & Reboleira, 2012).

Un hecho curioso es que se han encontrado muestras (A Cunchosa, Galicia, España) de espeleotemas cilíndricos en los cuales, las mudas de colémbolos cementadas forman la totalidad del depósito junto con los clastos, cementado todo por ópalo A (Figura 123) pudiendo tratarse de un *colembolotema*.

5.3.4.5.1.2. Tisanuros (Orden *Thysanura* - *Zygentoma*)

La mayoría de los tisanuros encontrados en cuevas se podrían clasificar como troglóxenos, especies que viven en la hojarasca de las bocas y que raramente profundizan más allá de la zona de entrada. Normalmente se alimentan de materias vegetales y madera muerta. Sin embargo, existen numerosas especies de tisanuros europeos que se refugian en las cuevas durante el invierno. Su principal contribución es el aporte de materia orgánica al medio.

5.3.4.5.1.3. Lepidópteros (Orden *Lepidoptera*)

La presencia de estos organismos en cuevas es rara, y por ello no se conocen especies estrictamente cavernícolas. Las que se han encontrado habitan en bóvedas y paredes de la zona de entrada, son de hábitos lucífugos e higrófilos y generalmente se trata de formas que acuden a las cuevas a estivar, invernar o reproducirse, pero no completan su ciclo vital y sólo están presentes parte del año. Este grupo ofrece al microecosistema del espeleotema, materia orgánica al deslizarse sobre estos y desprenderse de las escamas que recubren su cuerpo y alas. Coinciden con los encontrados por (López Galindo, 2013), aunque en este caso no se ha llegado a encontrar huevos sobre los espeleotemas.

5.3.4.5.2. Crustáceos (Subfilo *Crustacea*)

5.3.4.5.2.1. Isópodos (Orden *Isopoda*)

Su origen es marino y siendo el único grupo de *Crustacea* que ha colonizado el medio terrestre, les convierte en un grupo clave para estudiar la conquista de la tierra por parte de los artrópodos (Broly *et al.*, 2013) y, en este caso, el estudio de las cuevas como un medio de transición entre estos dos ambientes.

Los isópodos terrestres son los crustáceos que más éxito han conseguido en la colonización de los hábitats terrestres, un modo de vida que probablemente ya se

inició a finales del Paleozoico a partir de formas marinas litorales. Una característica única de este grupo, probablemente relacionada con la adaptación a la vida terrestre, es el sistema de conducción de agua por capilaridad (WCS-water conducting system), que supone para estos animales una solución a múltiples problemas de regulación bajo condiciones terrestres (osmótica, térmica, excretora, etc.) y probablemente la adaptación que más les ha servido para permanecer en las cuevas continentales en su paso desde la vida marina a la terrestre. Al alimentarse de materia orgánica muerta juegan un papel clave en el reciclaje de nutrientes y, sobre todo, en el reciclaje de los pocos aportes de materia orgánica que existen en las cuevas estudiadas.

5.3.4.5.3. Quelicerados (Subfilo *Chelicerata*)

En cuanto a los artrópodos encontrados en este trabajo, un ejemplo son los ácaros Oribatidos, ya citados anteriormente por otros autores en medios cavernícolas (Lundberg *et al.*, 2010; Vidal Romaní *et al.*, 2010b; López Galindo, 2013; Vidal Romaní *et al.*, 2014b), los cuales son microbívoros u omnívoros o detritívoros que se alimentan de biofilms algales.

5.3.4.5.3.1. Ácaros (Orden *Acarina*)

Estos organismos aparecieron en los mares del Cámbrico hace más de 500 millones de años y desde entonces han sido el grupo dominante sobre la Tierra, siendo los primeros animales que pasaron del ambiente acuático al terrestre, incursionando tierra adentro y adaptándose a todos los hábitats. Esta característica de los ácaros es muy interesante en el estudio de las cuevas como medio de transición, entre el medio marino y terrestre y en el que, probablemente, se hayan desarrollado los primeros organismos que habitaron los continentes. Además, estudiar los ácaros en las cuevas es interesante ya que suelen tratarse de especies parásitas de quirópteros que se alimentan de su sangre; por eso son frecuentes en cuevas guanobias, frecuentadas por murciélagos (Galán, 1993). La familia *Ixodidae* contiene la muy conocida especie *Ixodes verpertilionis*, ectoparásito del género *Rhinolophus* que es el encontrado mayoritariamente en las cuevas estudiadas.

En ocasiones, estos organismos permanecen vivos hasta el momento de estudio y se encuentran desplazándose sobre el depósito (Figura 124). Estos tienen una importante función en el espeleotema, ya indicada por Lundberg *et al.* (2010) como removedores de los granos de la fábrica detrítica; así como es interesante, también, cómo modifican los espeleotemas para crear sus madrigueras y puestas. El estar

asociados a espeleotemas más arenosos y secos de tipo flowstone, concuerda con su capacidad para responder a los cambios ambientales de temperatura (Liu *et al.*, 2017) que ocurren en las cuevas y por ello, también son más abundantes en los espeleotemas provenientes de zonas más secas (Extremadura y Australia). De hecho, los grupos que más responden a estos cambios (Oribatida) (Liu *et al.*, 2017) y capaces de sobrevivir en el tiempo, son los más abundantes en las cuevas estudiadas.

5.3.4.6. Vertebrados

En cuanto a los vertebrados, los organismos que más influencia tienen en la misma desde el punto de vista trófico son los quirópteros. Las cuevas les otorgan el alimento necesario para alimentarse y ambiente para resguardarse. El guano que excretan, juega un papel esencial en la nutrición de los microorganismos cavernícolas y es utilizado por diversas especies omnívoras, principalmente colémbolos y dípteros (Galán, 1993). Los más típicos se caracterizan por poseer unos típicos apéndices o excrecencias nasales en forma de herradura, de donde deriva su nombre común de murciélagos de herradura.

5.3.5. Otros restos biológicos

5.3.5.1. Polen

El polen encontrado en las muestras estudiadas concuerda con la vegetación de los entornos de las cuevas de donde proceden las muestras. Algunos ejemplos son el polen perteneciente a *Acacia*, una especie típica de Australia y que ha sido encontrada en las cuevas allí estudiadas. Así como el correspondiente a la especie *Acer* que es típica de las regiones templadas del hemisferio norte y ha sido encontrado en el sur de España. La especie *Alnus* que se asocia a zonas húmedas, también se ha encontrado en muestras del Norte de Portugal, donde predomina este tipo de clima húmedo.

5.3.5.2. Fitólitos

Entre los microfósiles utilizados para realizar reconstrucciones paleoecológicas, además de los granos de polen y esporas se encuentran los fitólitos. Estos microrestos contienen un enorme potencial ya que, además de su valor para obtener información paleoecológica, pueden ayudar también a responder cuestiones arqueológicas relacionadas con el uso y la explotación de los recursos vegetales (Carrión, 2015); así como mejorar nuestra comprensión sobre los procesos de formación de los depósitos en cuevas.

Existen un porcentaje de taxones que no generan fitolitos mientras que otros son grandes productores, como las monocotiledóneas y, dentro de ellas, las gramíneas (Piperno, 2006; Carnelli *et al.*, 2004). Sus características morfológicas permiten su identificación hasta el nivel de especie. Su estudio ha sido ampliamente usado para análisis de paleoecología del Neolítico y existen trabajos desarrollados en cuevas donde estos han llegado a formar planchas estalagmíticas (Carrión, 2015) y donde aparecen sobre depósitos similares a los tratados en esta tesis (López Galindo, 2013).

La razón por la que se conservan sobre la superficie de los espeleotemas, es porque presentan gran resistencia a procesos postdeposicionales debido a su naturaleza mineral. Son muy resistentes a las condiciones ambientales como altas temperaturas pero pueden alterarse tanto por acción química como mecánica. En el caso de los espeleotemas, los fitolitos se integran en el sedimento como elementos de fábrica y los efectos postdeposicionales y diagenéticos, pueden alterar o destruir su estructura, lo que hace más difícil su identificación.

En este caso su estudio sería interesante como el señalado anteriormente para el polen, ayudarían a dilucidar la flora subyacente de los terrenos donde se sitúan las cuevas, tanto ahora como en el pasado.

5.4. APORTACIONES DEL ESTUDIO DE LA VIDA EN ESTAS CUEVAS

5.4.1. El origen de la vida y transición a medios terrestres

Las cuevas juegan un importante papel en el estudio del origen de la vida en la Tierra y en la colonización en los continentes, así como su estudio puede aportar datos para la búsqueda de vida extraterrestre (Rummel *et al.*, 2014). La razón de buscar vida en ellas, es que en su interior los organismos viven en un ambiente geológicamente estable que les sirve de protección. Por esto se piensa que, cuando aún no existía la capa de ozono en la atmósfera terrestre, las cuevas serían un medio favorable donde protegerse de la exposición a la radiación ultravioleta; en la Tierra, al final del Precámbrico, y en la actualidad en otros planetas.

Las cuevas estudiadas, al poseer características intermedias entre el medio marino y terrestre proporcionarían a las primeras formas de vida un ambiente favorable para su adaptación a ambientes aéreos en el Precámbrico. Este proceso de colonización empezaría a través de las cuevas marinas, alternativamente inundadas y dejadas en seco durante las grandes oscilaciones mareales, debido al relieve muy poco

pronunciado en las zonas continentales; esto implicaría una mayor vulnerabilidad a la inundación durante las transgresiones marinas y una más rápida emersión de las zonas inundadas durante las regresiones marinas (Figura 125); así como gracias a levantamientos continentales por isostasia. En esta temprana colonización de las zonas continentales, los organismos bacterianos se adaptarían a las condiciones de vida subaérea al coincidir circunstancias favorables a su supervivencia en ese tipo de ambientes: humedad y protección de la radiación ultravioleta (Rummel *et al.*, 2014), gracias a la pantalla que le proporcionaban techo y paredes de la cueva. Esta transición de la vida desde el medio epicontinental al litoral también se vería favorecida por el fenómeno de afloramiento o *Upwelling*, que produce el acercamiento del plancton desde las aguas epicontinentales a las aguas litorales (Figura 126). En periodos de transgresión marina, la entrada de estos microorganismos en las cuevas les permitiría posteriormente adentrarse en el continente sin depender de la resistencia a las condiciones continentales externas. Más tarde, sí tendrían que sobrevivir a ambientes oligotróficos donde las condiciones de escasez de nutrientes y de sequía primarían, desarrollando formas de resistencia (esporas) que les permitirían persistir tras las épocas de condiciones más extremas. En efecto, existen casos conocidos en las cuevas donde se desarrollan procesos específicos de adaptación tales como aumento de antioxidantes (Osborn *et al.*, 2015) y otros metabolitos protectores debido a la ausencia de luz, pH, nutrientes y estrés hídrico en determinadas estaciones del año. Progresivamente, estas condiciones pasarían a darse también en zonas continentales más internas debido al transporte de los terrenos por tectónica de placas, apareciendo ya formas evolucionadas de organismos continentales protegidos por la capa de ozono creada por los organismos fotosintetizadores. Una muestra de esto es la adaptabilidad de las comunidades de bacterias al ambiente cavernícola, demostrada por la gran biodiversidad que se ha podido detectar en las muestras analizadas y que se contrapone con la escasa biodiversidad que se aprecia en muestras de ambientes con mayor contacto al exterior. En esos puntos, la mayoría de las bacterias encontradas son las fotosintetizadoras o cianobacterias, dado que se han adaptado a esas condiciones de desarrollo, compitiendo e impidiendo así el crecimiento de otras. Mientras tanto, los ambientes subsuperficiales seguirían manteniendo sus características primitivas, donde los organismos sencillos continuarían el establecimiento de comunidades características que perdurarían en el tiempo, hasta crear microcomunidades hoy en día estables y homogéneas que se extienden a lo largo de todo el Mundo.

De manera similar esto puede haber ocurrido en otros planetas rocosos (Northup *et al.*, 2011; Sleep *et al.*, 2010) que temporalmente pudieron haber tenido masas

oceánicas de agua y que aun ahora, como ocurre en la Tierra pueden existir cuevas en las que, a pesar de la desaparición de los océanos, pueden haber sobrevivido este tipo de organismos. Sin embargo, ya que la existencia de océanos libres en la superficie de otros planetas parece haber sido mucho más breve, la evolución biológica no habría podido evolucionar en ellos más allá de la etapa microbiana. En cualquier caso, las posibilidades de existencia de formas de vida solo podrían reconocerse bien en sedimentos marinos, bien en los sistemas de cavidades actuales. La Tierra, por esto, sería el modelo de evolución máxima como planeta donde se ha evolucionado a ambientes continentales subaéreos, mientras que en otros planetas la colonización del continente habría quedado truncada en el desarrollo de la vida microscópica relictas relegada a las cuevas.

Esta similitud de las cuevas a estudio con las cuevas que posiblemente albergan vida en otros planetas, no solo se corresponde con su ambiente geológicamente estable y protector, sino también por su litología; pues en el caso de planetas como Marte se sabe que alberga rocas de tipo magmático, similares desde un punto de vista químico a las que albergan las cuevas estudiadas en esta tesis. Nuestro estudio hace pensar que otros planetas, e incluso lunas donde se sabe que existe o puede existir agua, podrían haber albergado ambientes similares donde debería haber vida de características análogas a las estudiadas en este trabajo. Los estudios de la biodiversidad en las cuevas de rocas magmáticas en la tierra, no sólo nos proporciona información sobre los primeros organismos que colonizaron el medio, cómo lo hicieron y cómo eran las formas de vida primitiva aquí en la Tierra; sino que proporcionan la posibilidad de desarrollar técnicas de estudio y objetivos que desarrollar en un futuro en las posibles misiones (Blamont, 2014) a estos planetas del Sistema Solar. Es por esto que este trabajo podría entenderse como un ensayo en la Tierra para entender nuevas formas de búsqueda de la vida actual o primitiva fuera de la misma, así como ayudar a la interpretación del paleoclima (Epure *et al.*, 2017) donde se desarrollaron (Röling *et al.*, 2015).

5.4.2. Nuevas especies de extremófilos adaptadas a ambientes cavernícolas

La vida está dividida en tres dominios (Arquea, Bacteria y Eucariota), sin embargo, debido al desarrollo de técnicas de biología molecular cada vez más sofisticadas (metagenómica) y el desarrollo de nuevas tecnologías para la prospección de ambientes poco estudiados como son estas cuevas, se puede encontrar nuevas especies (Lee *et al.*, 2012), e incluso formas de vida que no se situarían en ninguno

de esos dominios (Woyke & Rubin, 2014). Para encontrar nuevas ramas del árbol de la vida, es necesario incluir en el estudio de la biodiversidad ambientes profundos situados por debajo de la superficie terrestre a decenas o centenares de metros y a incluso kilómetros (Sendra *et al.*, 2012) (Figura 127).

Las amebas testáceas son los organismos más diversos encontrados en las cuevas estudiadas, debido a la abundancia de silicio, característico de las rocas magmáticas, elemento necesario para formar sus testas. Sin embargo, se sabe que su clasificación taxonómica está incompleta debido a que los avances en Biología molecular y las técnicas de microscopía electrónica han revelado la existencia de nuevas especies e incluso morfotipos que difieren bastante del ejemplar tipo. Lo que convierte a las cuevas estudiadas en fuente de nuevas especies.

5.4.3. Aplicaciones biotecnológicas

Las bacterias que albergan las cuevas estudiadas en este trabajo excretan ácidos orgánicos y biomoléculas con multitud de aplicaciones biotecnológicas (Cheeptham *et al.*, 2013; Riquelme & Northup, 2013) por lo que se abre un nuevo campo de estudio. En el caso de las Actinobacterias, que son las que presentan la mayor abundancia en estas cuevas, su estudio es interesante desde el punto de vista de la biomedicina y biotecnología, dado que están siendo ampliamente utilizadas para sintetizar antibióticos (Riquelme *et al.*, 2015a; Derewacz *et al.*, 2014; Cheeptham, 2013; Lazzarini *et al.*, 2000). Por lo que, ampliar los estudios de estos microorganismos a las cuevas podrían ayudarnos a identificar nuevos antibióticos y otros productos biotecnológicos (Lazzarini *et al.*, 2000; Bhullar *et al.*, 2012, Cheeptham *et al.*, 2013).

Además, la biomineralización ejercida por los microorganismos en las cuevas podría aportar nuevas aplicaciones en la industria de los compuestos fabricados con silicio. En las cuevas estudiadas se ha visto que podrían existir bacterias capaces de catalizar un tipo de enlace duro y flexible (Si-O) que proporciona importantes aplicaciones fisicoquímicas como: la actividad superficial, la termoestabilidad y la estabilidad química (Frampton & Zelisko, 2009); así que su estudio podría ser interesante para la fabricación de estos compuestos de una forma ecológica y más eficiente. Estos organismos capaces de incorporar silicio en sus células corresponden a las formas de vida con metabolismos más primitivos, que han quedado relegados a las cuevas y, cuyo citocromo-c tiene la capacidad de asimilar silicio produciendo los llamados organosilicatos pudiendo estos, en un futuro, tener nuevas aplicaciones biotecnológicas. Un ejemplo sería la biocatalisis modificada por técnicas de biología

molecular para producir nuevos procesos catalíticos en sistemas microbianos, lo que sería una fuente de recursos renovables y de bajo coste (Kan *et al.*, 2016) que permitiría eliminar la utilización de metales de transición, ácidos y bases fuertes y temperaturas y presiones extremas (Frampton & Zelisko, 2009). También se ha visto el potencial en este aspecto que tienen las lipasas de algunas bacterias presentes en las cuevas y que se supone son las que ayudan a estos a crecer contra gravedad formando el ópalo biogénico (Frampton & Zelisko, 2009)

5.4.4. La nueva química de la vida basada en el silicio

En un principio, la razón por la que hasta ahora se había considerado los medios subterráneos pobres en cuanto a biodiversidad, era debido a que se aceptaba generalizadamente que los organismos construyen sus células a partir de moléculas basadas en el carbono. Sin embargo, en los últimos tiempos los científicos empezaron a considerar la posibilidad de que los átomos de silicio cuyos enlaces químicos se disponen de forma similar a los del carbono, podrían constituir una base bioquímica alternativa para la vida (Service, 2016; Kan *et al.*, 2016). Hasta ahora se había pensado que el silicio, que constituye el 28% de la corteza del planeta (frente al 0,03% de carbono), estaba casi totalmente ausente en la química de la vida. Sin embargo, se ha encontrado una enzima bacteriana que incorpora el silicio de manera eficiente en hidrocarburos simples (Service, 2016; Kan *et al.*, 2016). Esto abre la posibilidad de que los organismos que se han encontrado en nuestras cuevas y principales formadores de los espeleotemas, sean capaces de incorporar el silicio en sus células, y con ello dar lugar a una novedosa química de la vida a partir de una enzima bacteriana responsable de incorporar el silicio a los carbohidratos (Service, 2016). Aunque por el momento la creación de vida real basada en el silicio parece una línea de trabajo aun poco conocida, la presencia de bacterias en estos medios que están ligadas a la formación de ópalo amorfo podría ser una fuente de microorganismos en los que se dieran las rutas biosintéticas de enlaces Si-C (Klare & Oestreich, 2016). Los compuestos de hidrocarburos enriquecidos en silicio, llamados organosilanos, probablemente no son útiles para las bacterias, pues son cortos y ramificados, pero abren nuevas perspectivas para la química compleja a temperaturas y presiones moderadas y para la posibilidad de encontrar microbios evolucionados capaces de producir materiales complejos basados en el silicio. La gran biodiversidad bacteriana encontrada en las cuevas de rocas magmáticas, nos plantea la posibilidad de que este proceso recién descubierto, y planteado por los investigadores en el laboratorio, esté relacionado con los medios subterráneos en cuevas de rocas magmáticas, tanto plutónicas como volcánicas, donde el Si es uno de los componentes más abundantes;

e incluso también en cuevas desarrolladas en otras rocas, aunque con diferencias según varíe su carácter félsico, básico o ultrabásico (Campbell, *et al.*, 2015; Daza & Bustillo, 2015; Miller *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2008).

5.4.5. Cuevas como reservorio para la conservación de especies vulnerables y nuevas especies

Las cavidades estudiadas en esta tesis son una primera contribución al conocimiento de la biodiversidad del medio subterráneo en ambientes graníticos. Estas cuevas difieren de la mayoría de las estudiadas en la bibliografía en que no son de caliza ni son turísticas, es por esto que son entornos mejor conservados donde no hay influencia antrópica. Esto ofrece un nuevo espacio donde proteger diversos organismos que en otros medios están amenazados y son vulnerables. Un ejemplo es el de los anfibios, la desecación de arroyos, canalización y desaparición de humedales, lleva al empobrecimiento en la calidad del hábitat habitual, por lo que la conservación de las cuevas estudiadas aumenta su valor como reservorios donde estos animales persistan. Por ello, los sistemas subterráneos necesitan una mayor protección debido, no sólo a la singularidad de los organismos que albergan (*Chioglossa lusitánica* es endémica del noroeste peninsular y catalogada en el libro rojo de los anfibios y reptiles de España como vulnerable) sino también porque son medios vulnerables a los cambios ambientales debido a su condición de hábitat fragmentado e irregularmente y espacialmente restringido a ciertas áreas.

La gran biodiversidad encontrada nos plantea pues, la posibilidad de que las cuevas estudiadas sean un reservorio de biodiversidad aún por descubrir. Además, debido a las particularidades y la gran diversidad filogenética, morfológica, genética y funcional respecto a la superficie (Trajano *et al.*, 2016) contribuyen a la diversidad global.

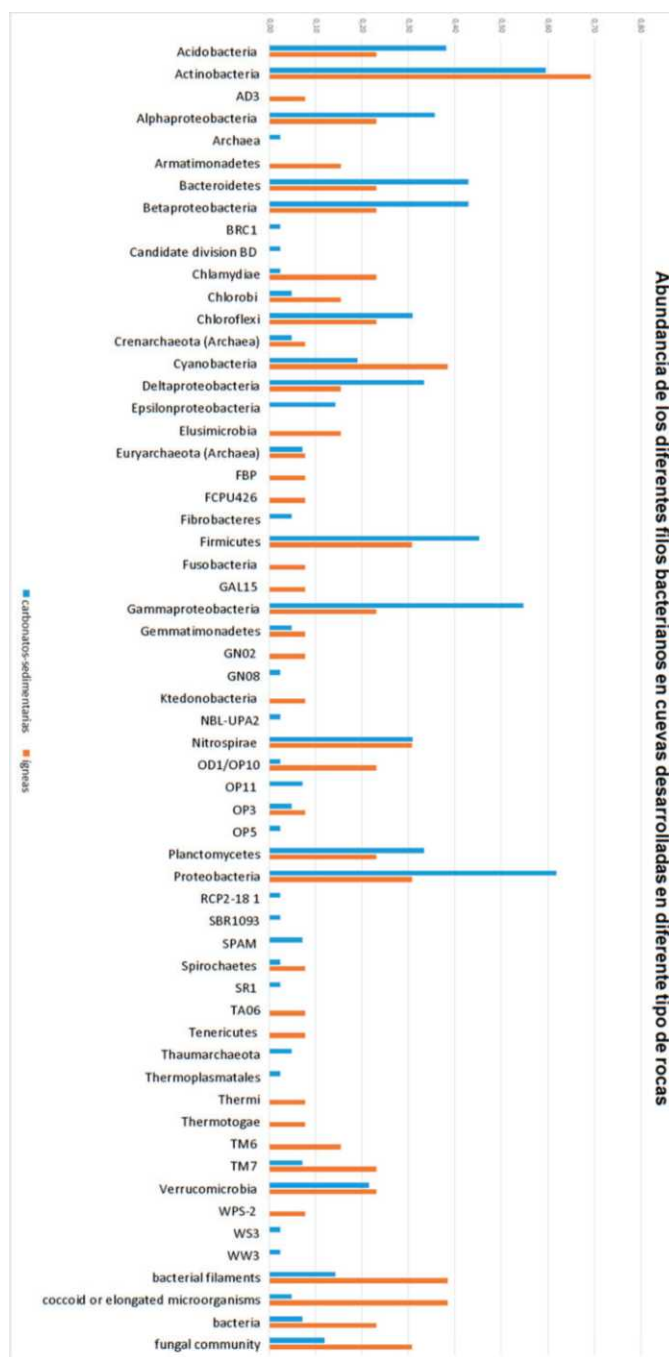


Tabla 1. Abundancia de los diferentes filos bacterianos y otros microorganismos en cuevas con diferente litología.

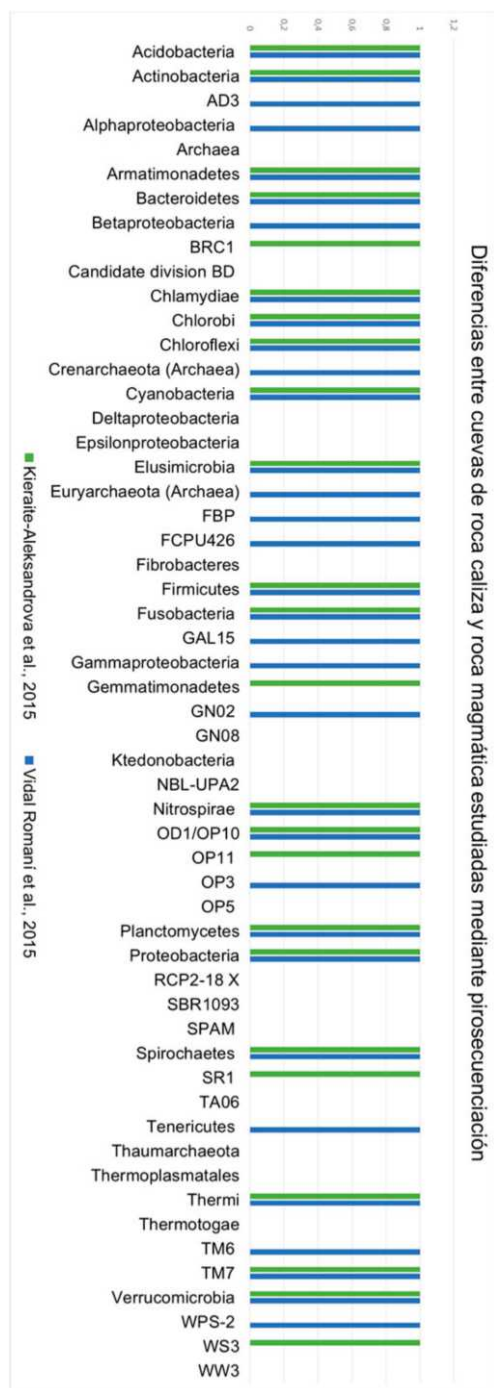


Tabla 2. Diferencias entre la distribución de filos en cuevas de rocas ígneas y calizas estudiadas por pirosecuenciación.

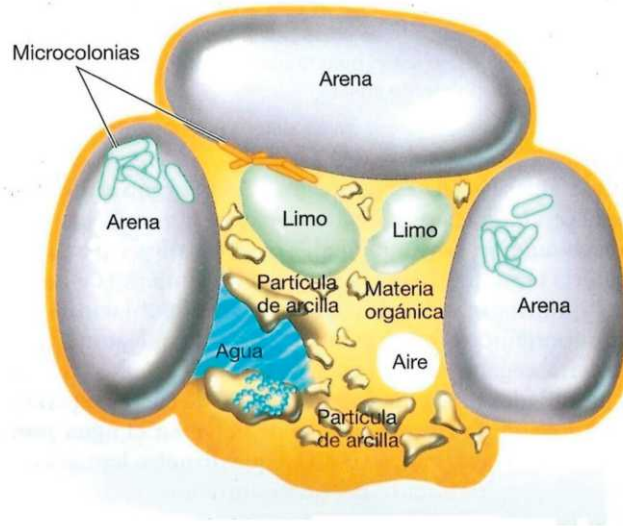


Figura 1

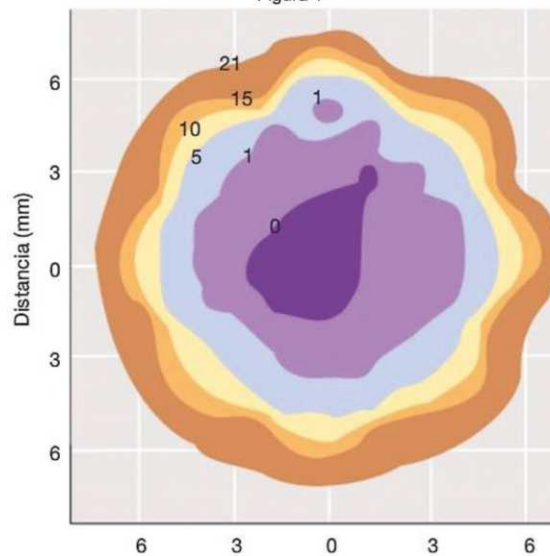


Figura 2

Figuras 1-2: 1. Un hábitat microbiano del suelo. Muy pocos microorganismos están libres en la disolución del suelo: la mayor parte de ellos residen en microcolonias adheridas a las partículas del suelo. Obsérvese la diferencia de tamaño relativo entre las partículas de arena, arcilla y limo (extraído de Madigan et al., 2009). 2. Microambientes de oxígeno. Mapa del perfil de las concentraciones de O_2 en una partícula del suelo. Los ejes muestran las dimensiones de la partícula. Los números sobre los perfiles son concentraciones de O_2 (en porcentaje, el aire contiene O_2 al 21%). En términos de relaciones de oxígeno para los microorganismos, cada zona se puede considerar un microambiente diferente. (Extraído de Madigan et al., 2009).

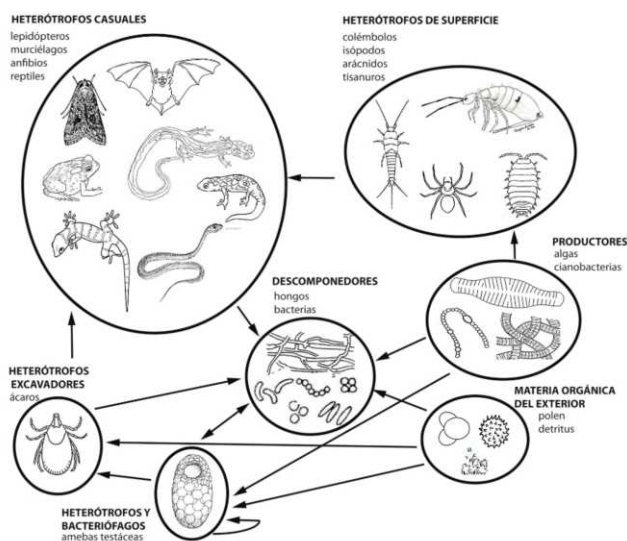


Figura 3

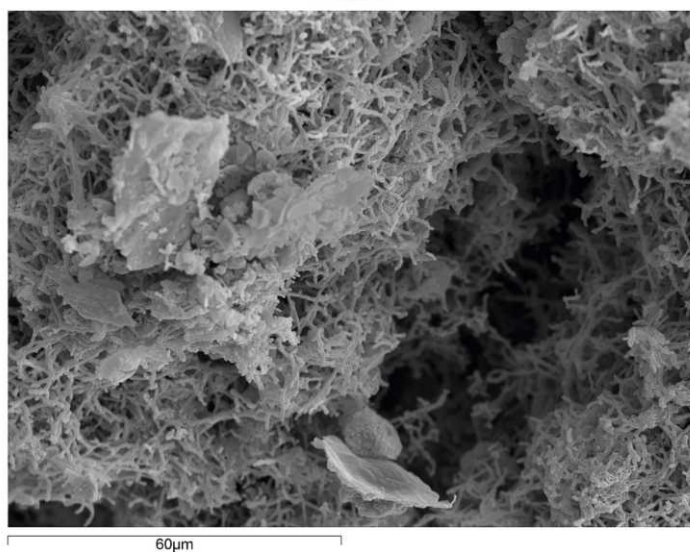


Figura 4

Figuras 3-4: 3. Relaciones tróficas del microecosistema que se establece sobre los espeleotemas. 4. Superficie del espeleotema colonizada por bacterias (Trapa Cave, Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

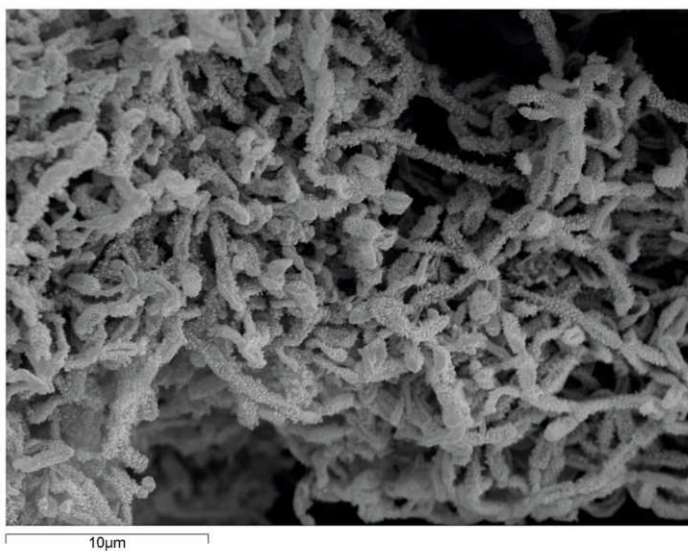


Figura 5

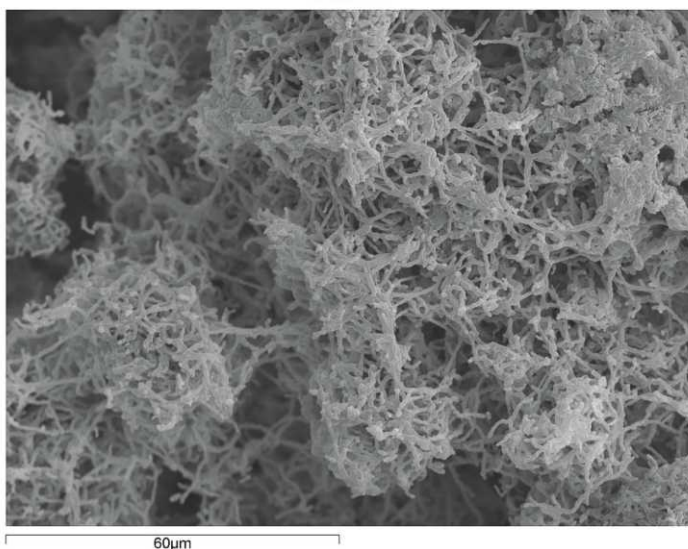


Figura 6

Figuras 5-6: Superficie del espeleotema colonizada por bacterias (Trapa Cave, Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

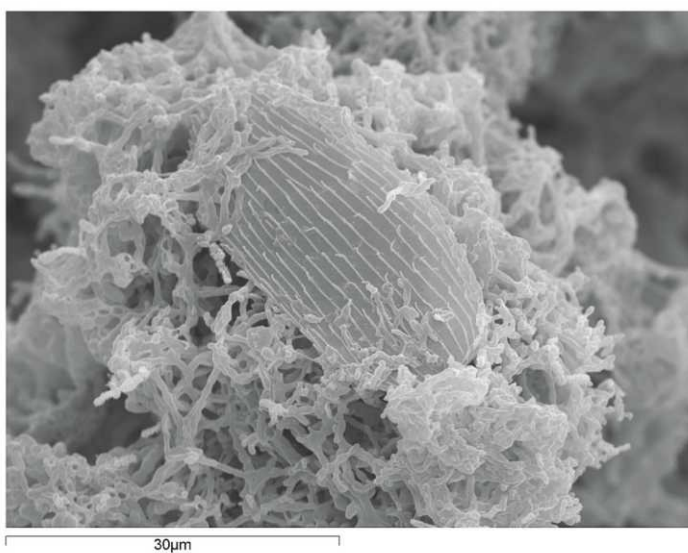


Figura 7

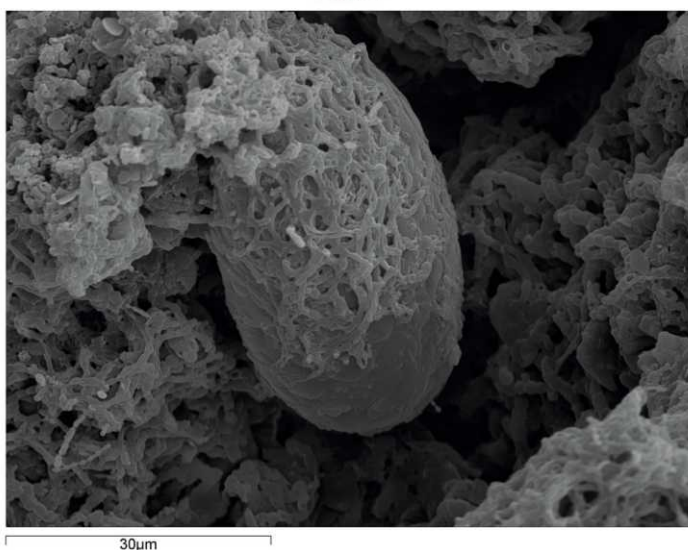


Figura 8

Figuras 7-8: 7. Bacterias filamentosas envolviendo una escama de colémbolo (Trapa Cave. Galicia, España). 8. Bacterias filamentosas envolviendo una ameba testácea (Trapa Cave. Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

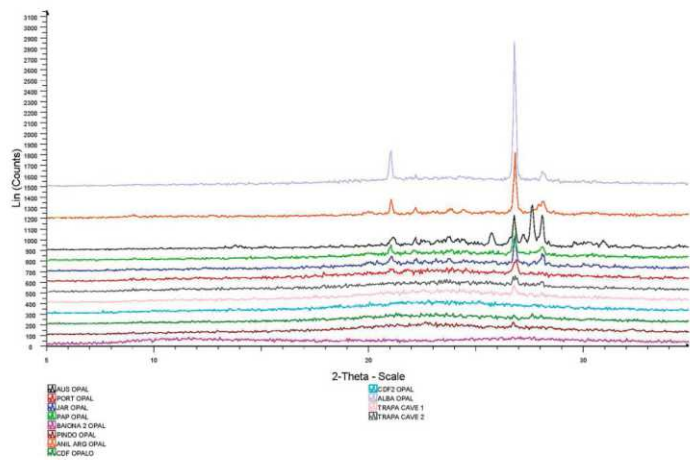


Figura 9

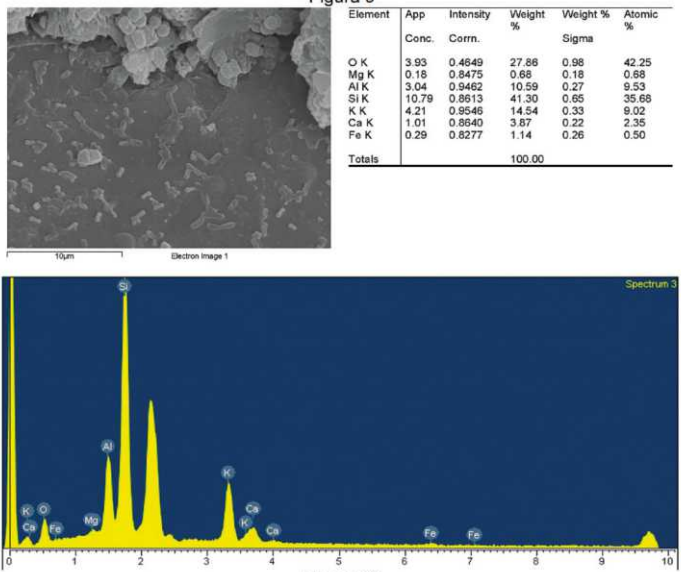


Figura 10

Figuras 9-10: 9. Difractograma de Rayos X donde se observa la estructura de ópalo-A en diferentes localidades, caracterizada por una banda prominente entre 15-30°. 10. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB de las muestras. Bodagrottor (Suecia).

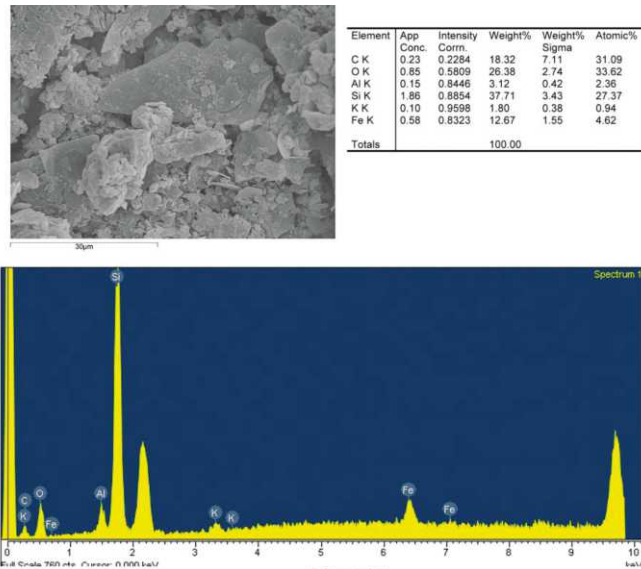


Figura 11

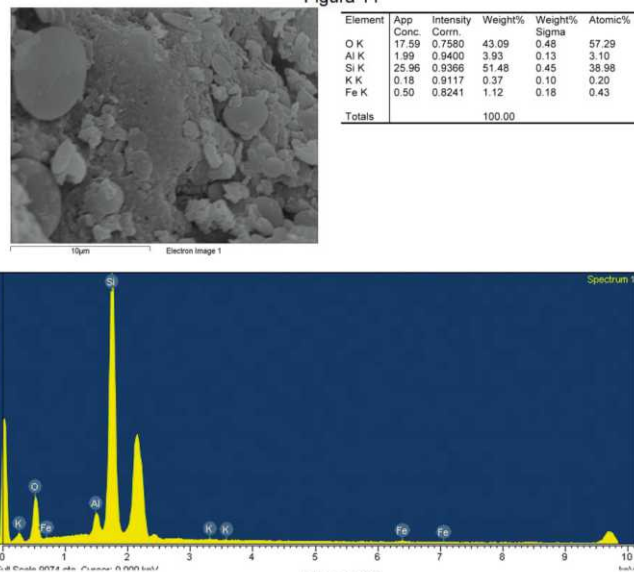


Figura 12

Figuras 11-12: 11. Análisis semicuantitativo realizado por difracción de electrones retrodispersados al MEB en microestromatolitos terrestres. A Trapa (Galicia, España).

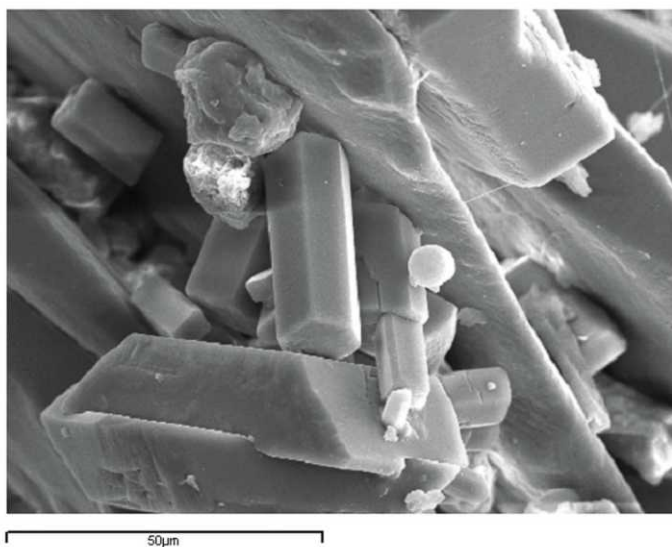


Figura 13

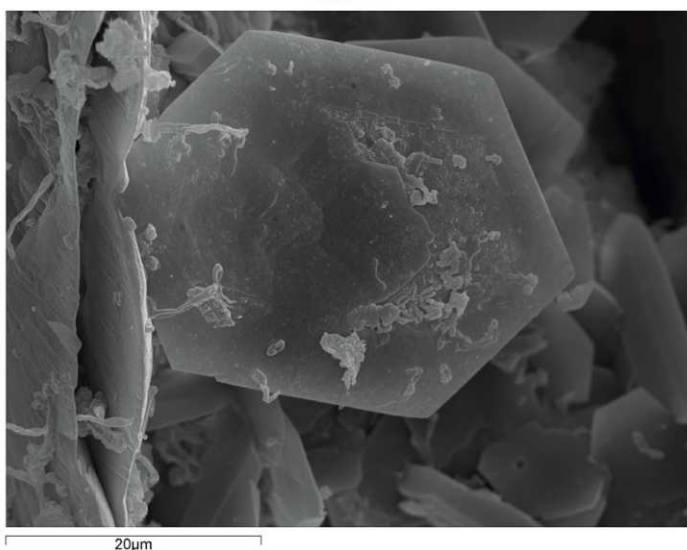


Figura 14

Figuras 13-14: 13. Drusa de yeso mostrando hábito monoclínico y hábito pseudoprismático hexagonal (anhidrita rómbica). 14. Cristal rómbico de anhidrita. La macla centrada adopta una simetría mayor (pseudohexagonal). Drömgrottan (Suecia). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

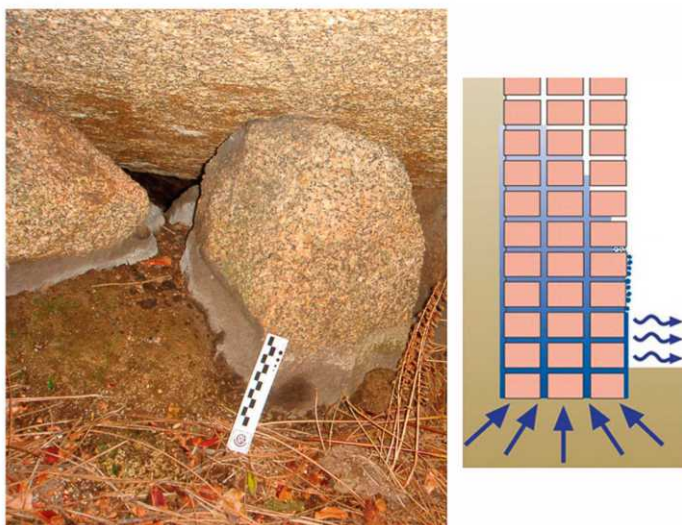


Figura 15

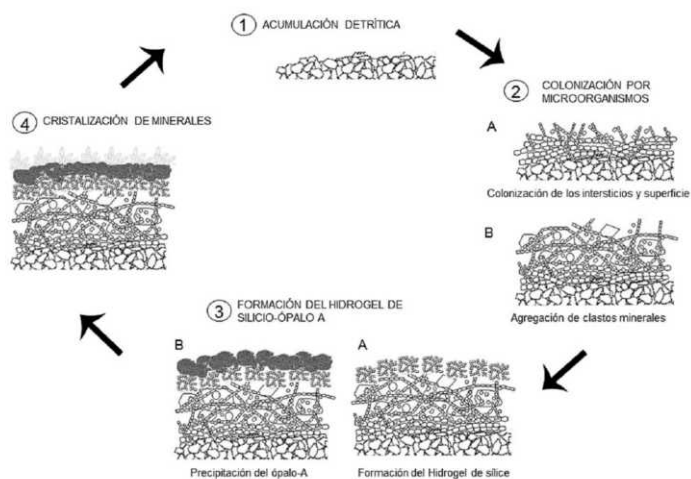


Figura 16

Figuras 15-16: 15. Formación de bioespeleotemas por ascenso capilar desde el suelo en O Pindo-Ézaro (Galicia, A Coruña). 16. Esquema de las fases de formación del espeleotema.



Figura 17

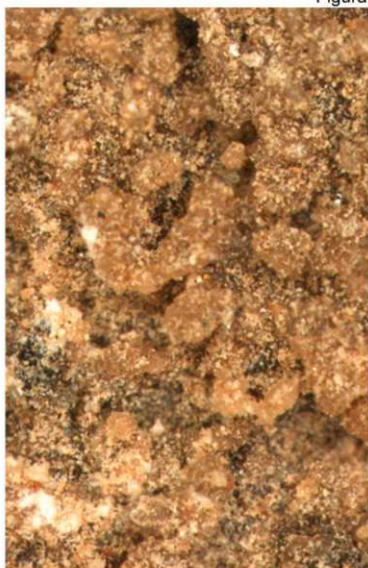


Figura 18

Figuras 17-18: 17. Ópalo A con colonización de microorganismos en su seno. Morcegos (Galicia, España). 18. Textura en espeleotema planar de tipo flowstone. (Pampa de Achala, Córdoba, Argentina). (Fotografía MEB Vidal Romani)



Figura 19

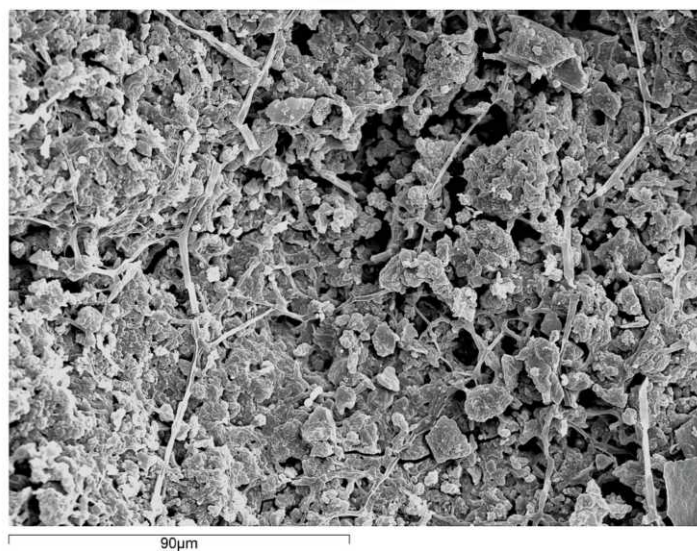


Figura 20

Figuras 19-20: 19. Clastos que constituyen las capas acrecionadas del espeleotema. A Trapa (Galicia, España). 20. Clastos y microorganismos en la fábrica porosa del espeleotema. Austria. (Fotos MEB Vidal Romaní, J.R.).

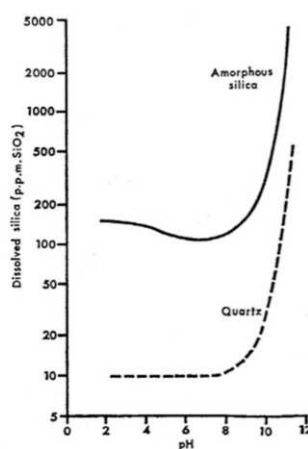


Figure 4 Solubility of silica at 25°C (from Krauskopf 1967)

The solid line shows the variation in solubility of amorphous silica with pH, as determined experimentally. The lower dashed line is the calculated solubility of quartz, based on the approximately known solubility of 10 p.p.m. SiO_2 in neutral and acid conditions.

Figura 21



Figura 22

Figuras 21-22: 21. Gráfico de la solubilidad de la sílice a 25°C (Krauskopf, 1967). 22. Textura granulada del espeleotema por crecimiento de bacterias. Berrocal del Rugidero (Extremadura).



Figura 23



Figura 24

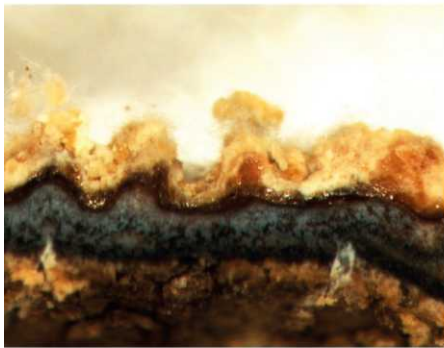


Figura 25



Figura 26

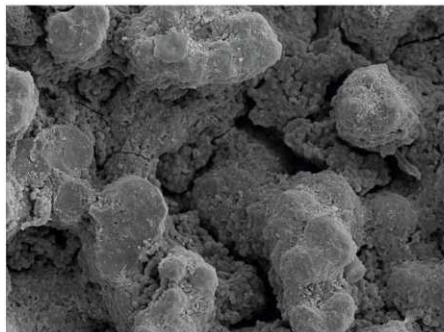


Figura 27

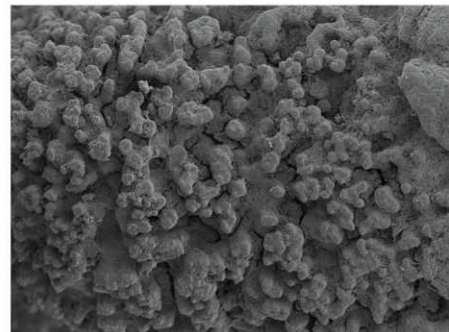


Figura 28

Figuras 23-28: 23. Textura granulada del espeleotema por crecimiento de bacterias y espeleotemas cilíndricos. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 24. Textura granulada del espeleotema por crecimiento de bacterias. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 25. Crecimiento del espeleotema por las bacterias en u.f.c. en visión transversal. Fighosa (Galicia, España). 26. Espeleotemas de tipo microstromatolitos terrestres en suelo. Gruta do Muro de Pedras (cortesía Grupo Pierre Martin de Espeleología, Brazil). 27. Crecimiento columnar del espeleotema debido a los microorganismos. Tcharkulda Rock (Australia) (Vidal Romaní, J.R.). 28. Crecimiento columnar del espeleotema debido a los microorganismos. Tcharkulda Rock (Australia) (Fotos MEB Vidal Romaní, J.R.).

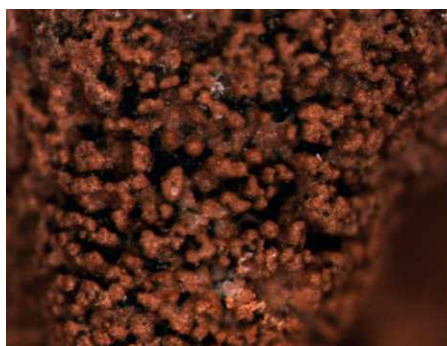


Figura 29



Figura 30

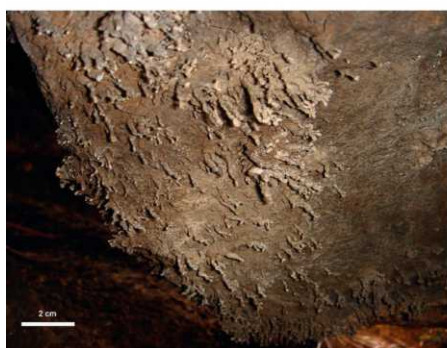


Figura 31



Figura 32

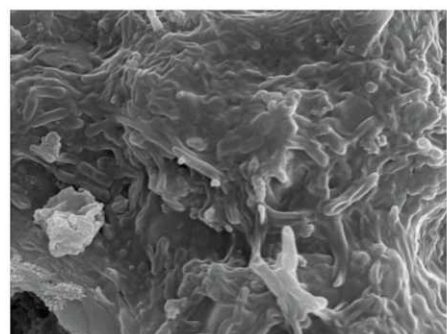


Figura 33

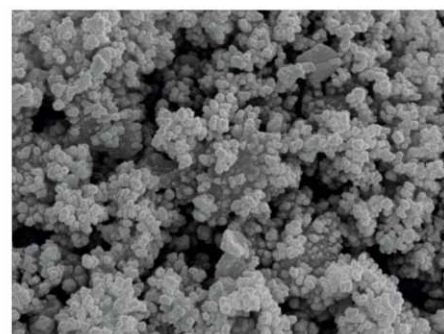


Figura 34

Figuras 29-34: 29-30. Crecimiento columnar del espeleotema debido a los microorganismos. Tcharkulda Rock (Australia). 31. Crecimiento de espeleotemas en césped en pared. Ézaro (Galicia, España). 32. Piscinas con ópalo A blanquecino entre los microgours. Trollhället (Suecia). 33. Bacterias filamentosas inmersas en hidrogel de silicio. Hölick Grottan (Suecia). 34. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas. Berrocal del Rugidero (Extremadura). (Fotos MEB Vidal Romani, J.R.).

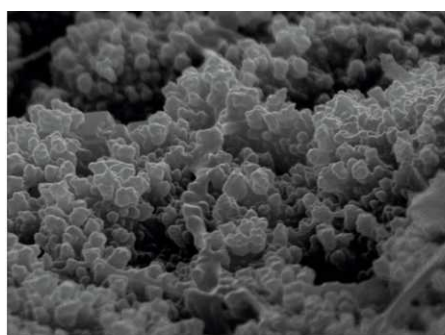


Figura 35

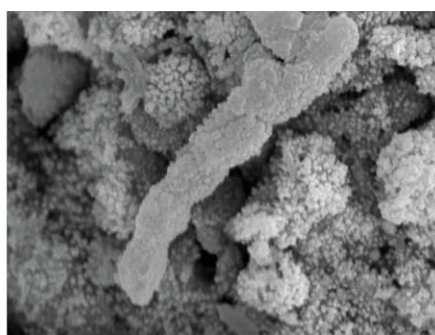


Figura 36

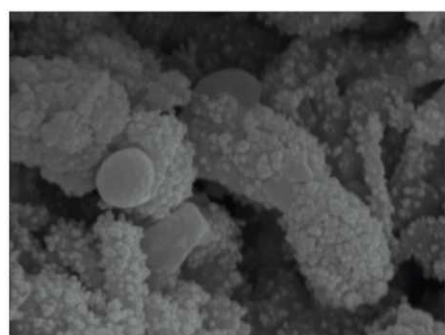


Figura 37

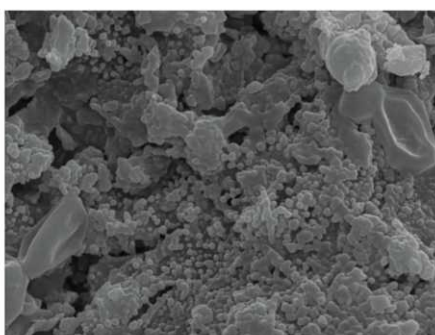


Figura 38

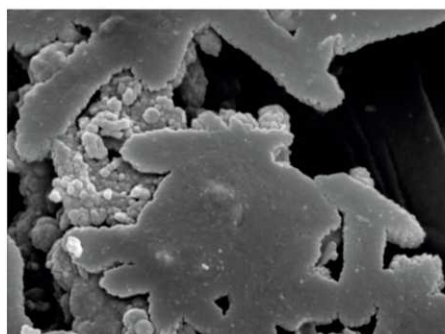


Figura 39

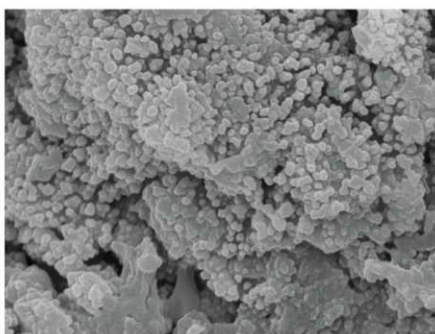


Figura 40

Figuras 35-40: 35. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas. Austria. 36-39. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas sobre microorganismos. Falkberget (Suecia). 40. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas. Fruberget (Suecia) (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

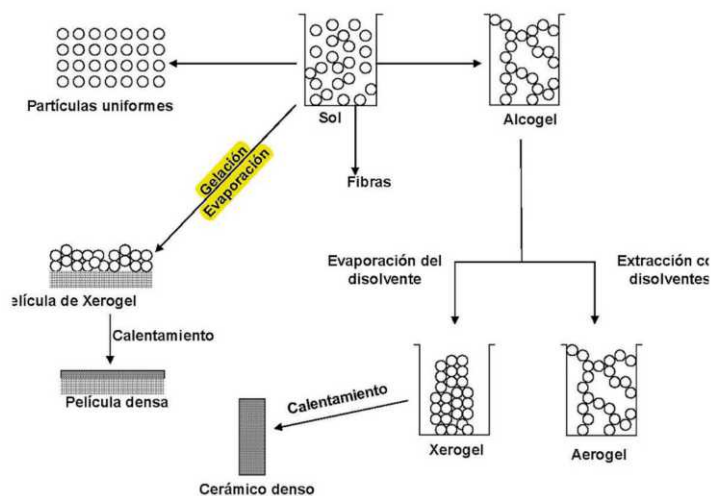


Figura 41

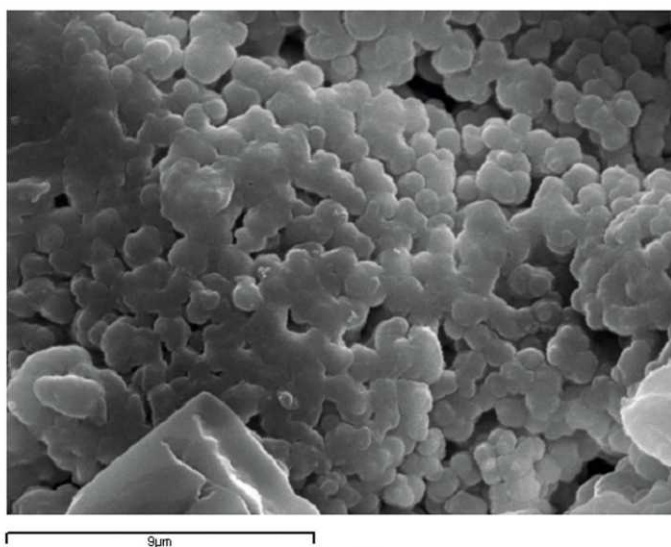


Figura 42

Figuras 41-42: 41. Proceso mediante el gel de silicio pasa de sol a gel gracias al proceso de concentración por evaporación (Cortés Escobedo, 2005). 42. Ópalo precipitando en forma de nanopartículas agregándose. Ávila (España). (Fotos MEB Vidal Romani, J.R.).

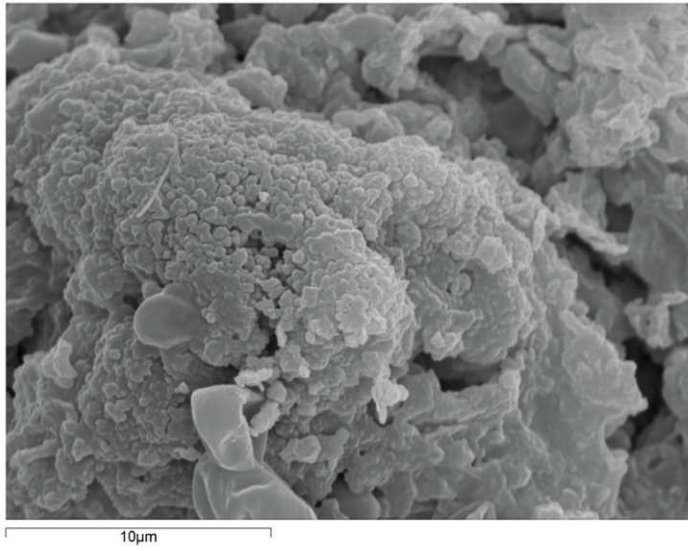


Figura 43

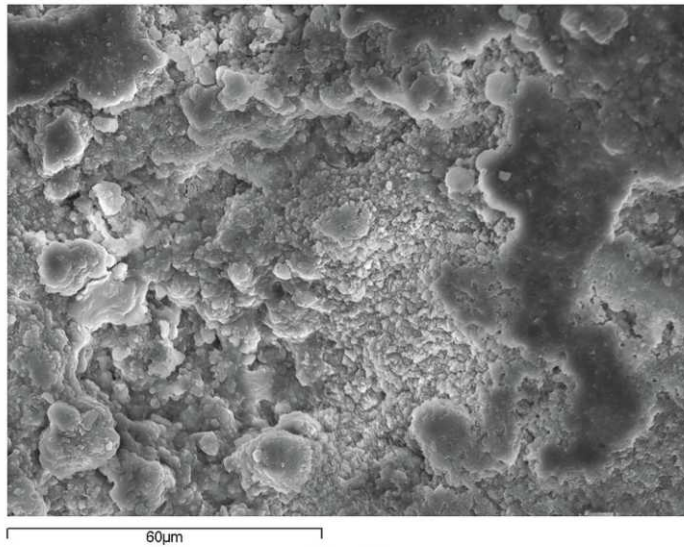


Figura 44

Figuras 43-44: 43. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas. Fruberget (Suecia). 44. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas agregándose. Ávila (España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

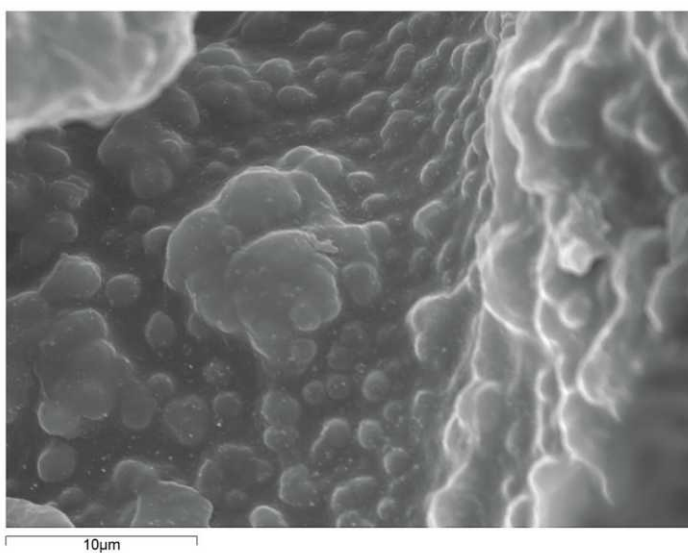


Figura 45

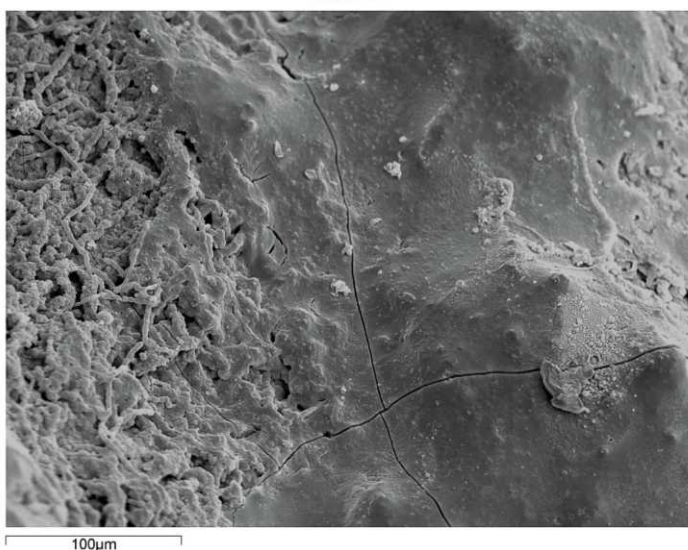


Figura 46

Figuras 45-46: 45. Ópalo precipitado en forma de lámina continua. Berrocal del Rugidero (Extremadura). 46. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas agregándose hasta formar una lámina lisa. Morcegos (Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

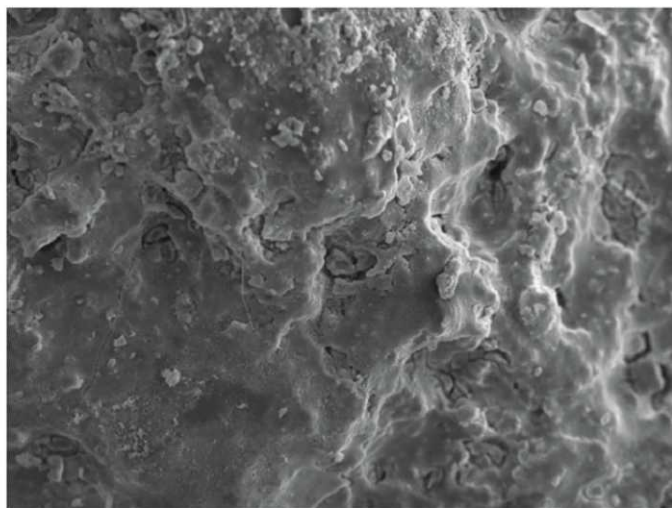


Figura 47

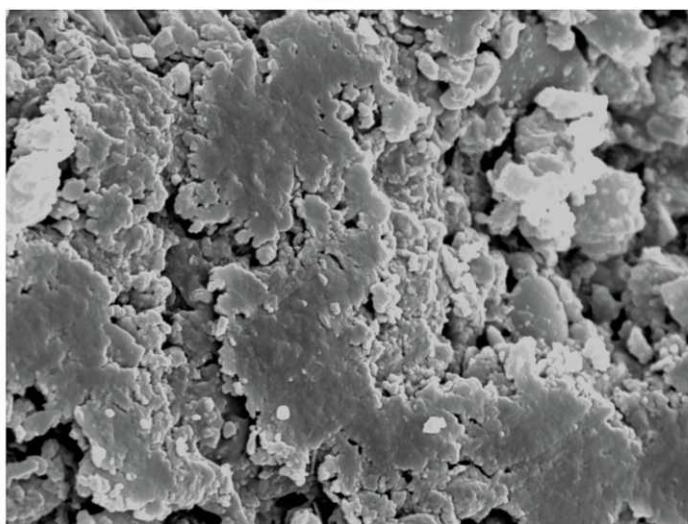


Figura 48

Figuras 47-48: 47. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas agregándose hasta formar una lámina lisa. El Zapato (Argentina) (Vidal Romaní, J.R.). 48. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas dejando bordes lobulados de la lámina formada. (Austria). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

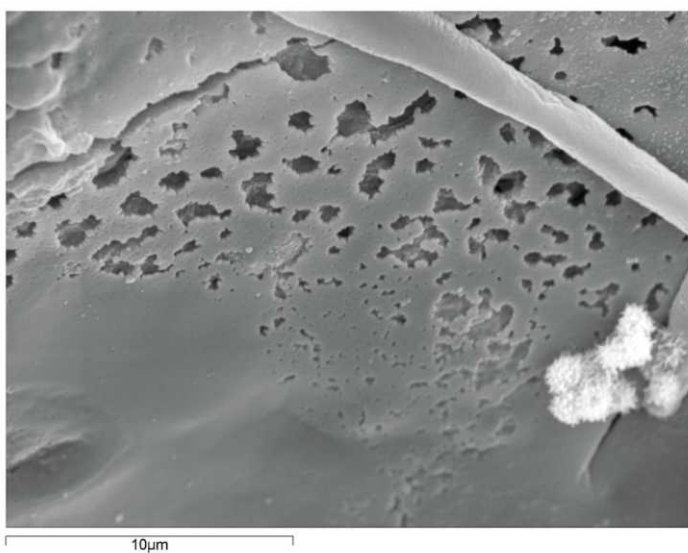


Figura 49

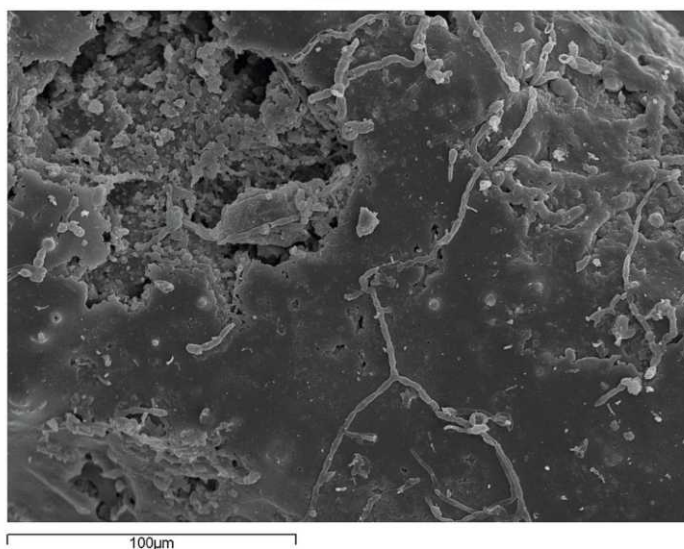


Figura 50

Figuras 49-50: 49. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas dejando bordes lobulados de la lámina formada y que se agregan dejando oquedades. Gundaring (Australia). 50. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas dejando bordes lobulados de la lámina formada y que se agregan dejando oquedades. Skálboberget (Suecia). (Fotos Vidal Román, J.R.).

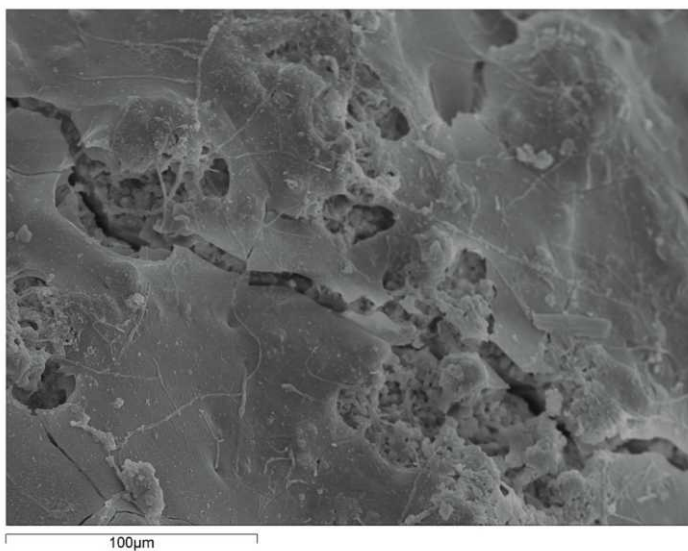


Figura 51

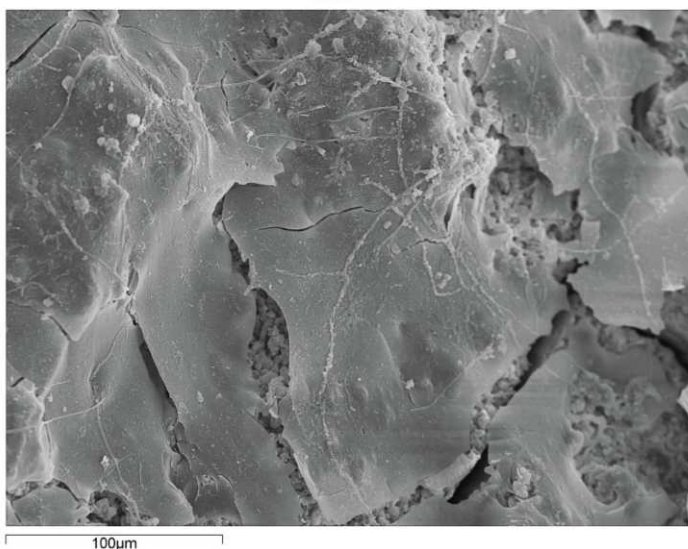


Figura 52

Figuras 51-52: 51. Precipitación del ópalo en láminas sobre la matriz clástica. Porteliña (Galicia, España). 52. Ópalo precipitado en forma de lámina continua que se rompe por el proceso de desecación. Porteliña (Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

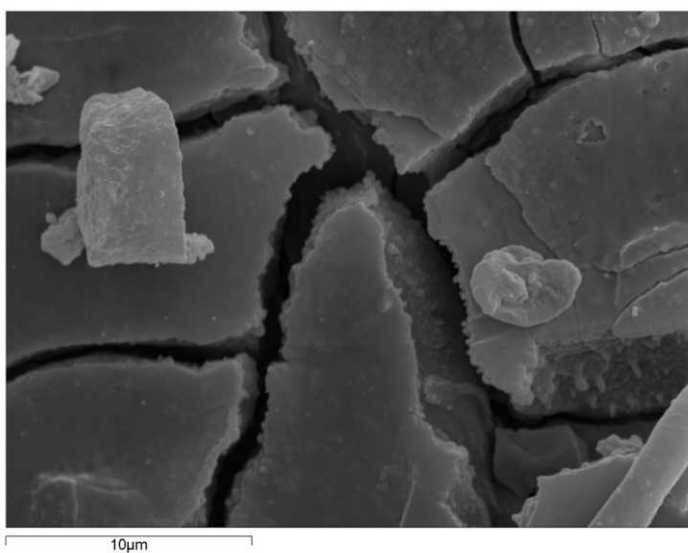


Figura 53

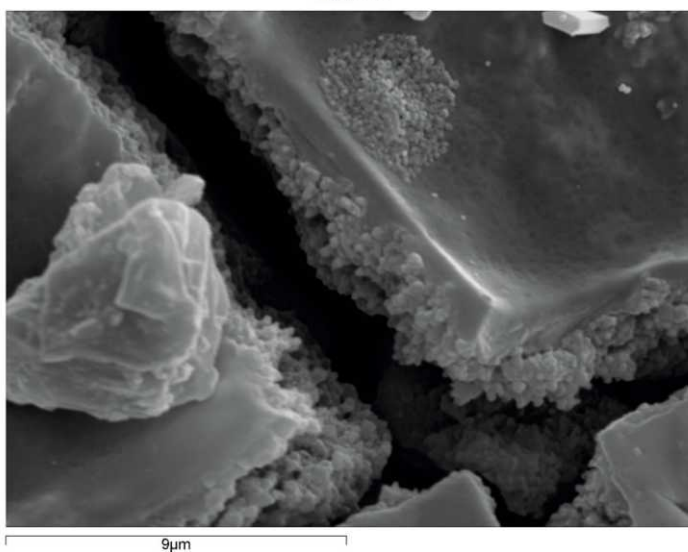


Figura 54

Figuras 53-54: 53. Grietas de retracción del ópalo por desecación. Gundaring (Australia) (Vidal Romaní, J.R.). 54. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas agregándose hasta formar una lámina lisa. Gundaring (Australia). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

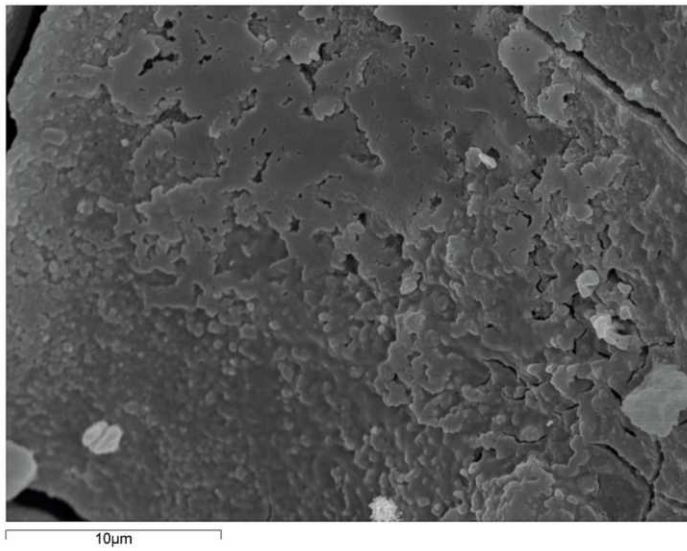


Figura 55

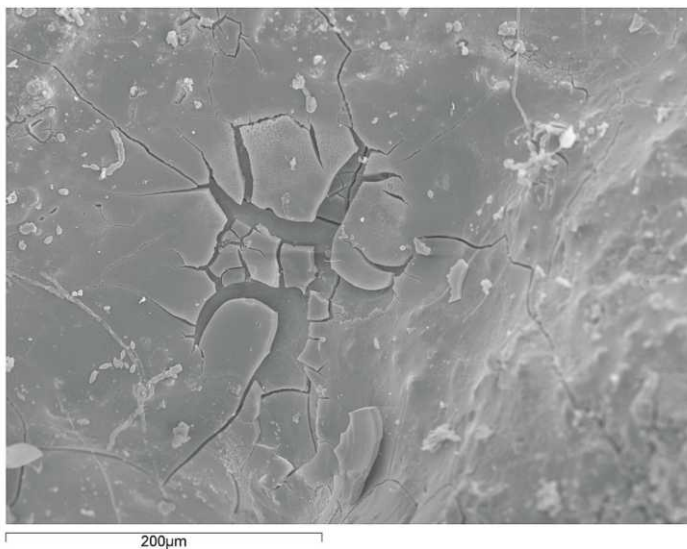


Figura 56

Figuras 55-56: 55. Precipitación del ópalo en láminas superpuestas. Gundaring (Australia) (Vidal Romaní, J.R.). 56. Precipitación del ópalo en láminas superpuestas con láminas de retracción en la superior. Gundaring (Australia). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

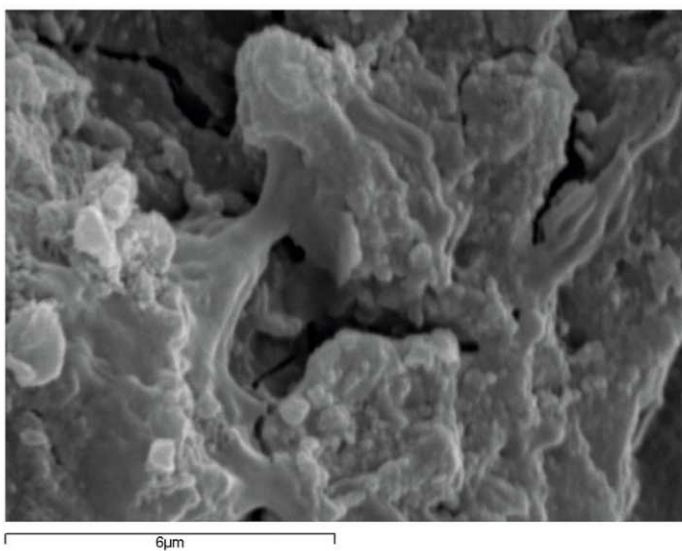


Figura 57

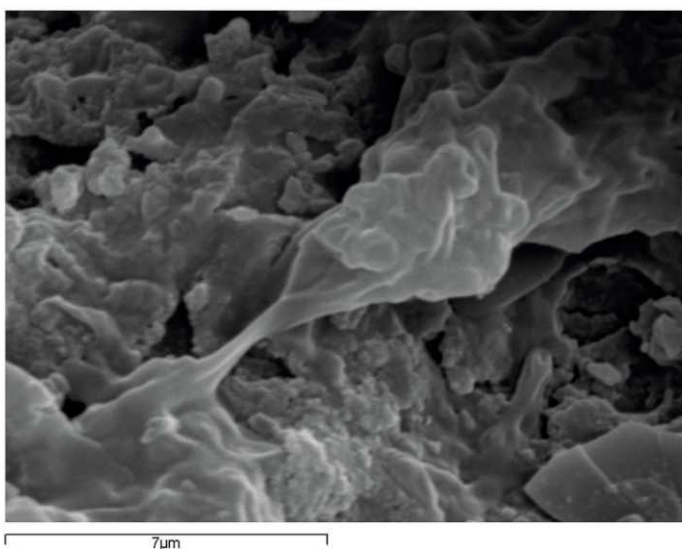


Figura 58

Figuras 57-58: Viscosidad del hidrogel de silicio. Hölick Grottan (Suecia). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).



Figura 59

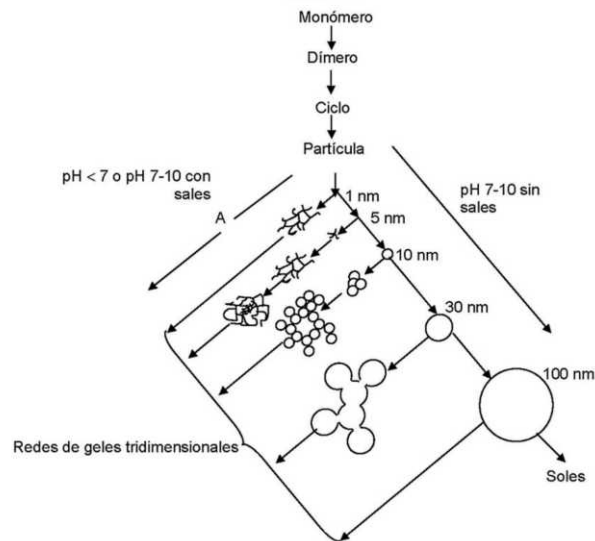


Figura 60

Figuras 59-60: 59. Crecimiento de espeleotemas por encima del nivel de inundación de la cueva (A Cunchosa, Galicia, España). 60. Comportamiento de la polimerización de sílice acuosa. En solución básica, las partículas crecen en tamaño pero disminuyen en cantidad. En soluciones ácidas o en presencia de sales floculantes, las partículas se agregan en redes tridimensionales y forman geles. Cortés Escobedo (2005)

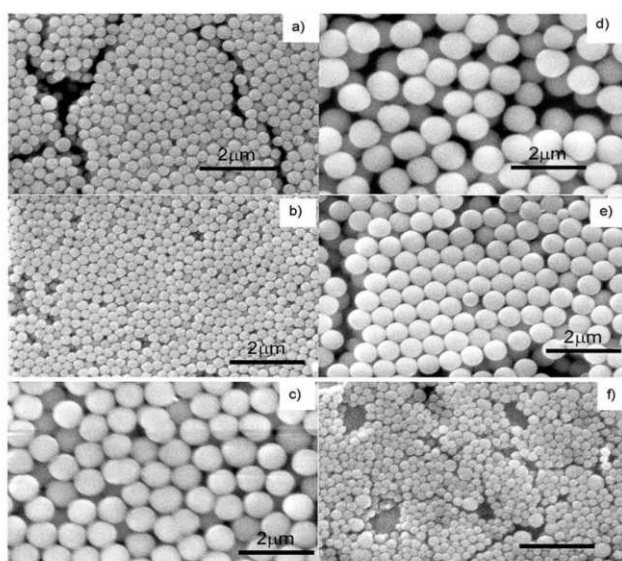


Figura 61

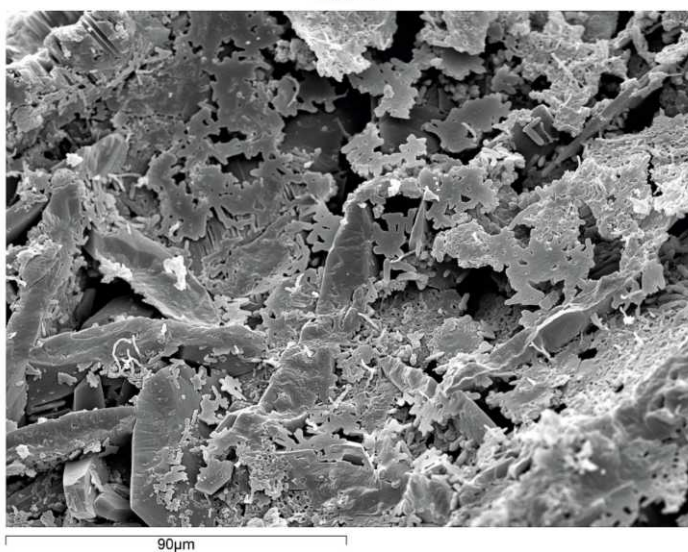


Figura 62

Figuras 61-62: 61. Comportamiento de la polimerización de sílice acuosa. En solución básica, las partículas crecen en tamaño pero disminuyen en cantidad. En soluciones ácidas o en presencia de sales floculantes (A), las partículas se agregan en redes tridimensionales y forman geles. Cortés Escobedo (2005). 62. Ópalo precipitando sobre microorganismos. Drömgrottan (Suecia). (Fotografía MEB Vidal Romání, J.R.).

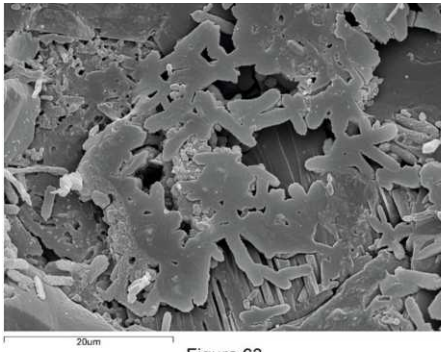


Figura 63

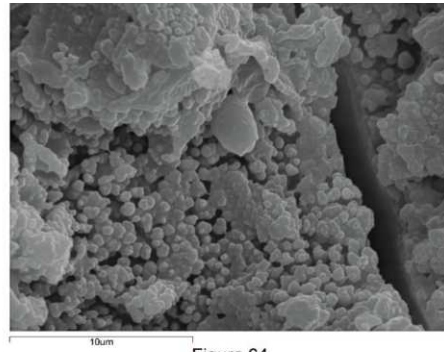


Figura 64

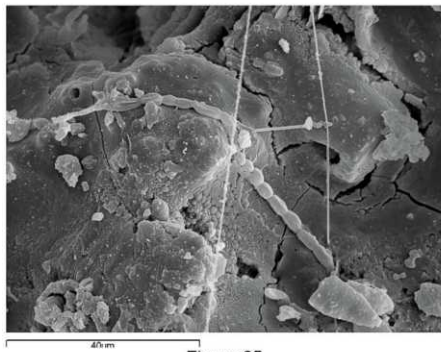


Figura 65

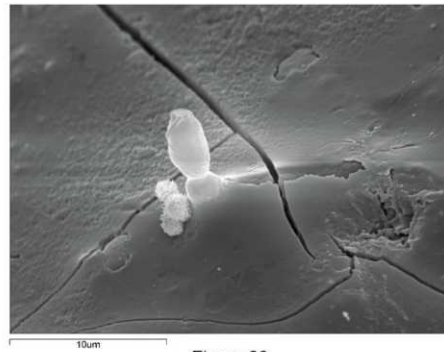


Figura 66

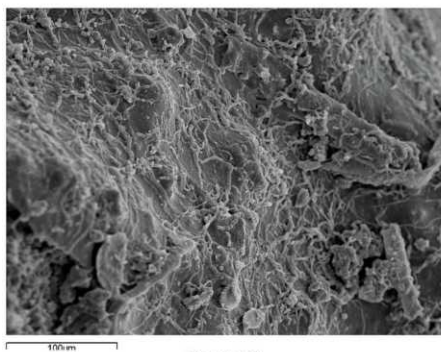


Figura 67

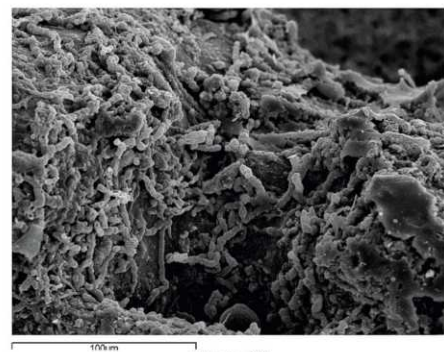


Figura 68

Figuras 63-68: Ópalo precipitando sobre microorganismos. Drömgrottan (Suecia). 64. Ópalo precipitando en forma de nanoesferas. Fruberget (Suecia). 65. Bacterias creciendo en y sobre el ópalo A rico en silicio. Pampa de Achala (Argentina). 66. Bacterias creciendo en el ópalo A rico en silicio. Gundaring (Australia). 67-68. Bacterias creciendo sobre el ópalo A. Skálboberget (Suecia). (Fotos Vidal Romani, J.R.).

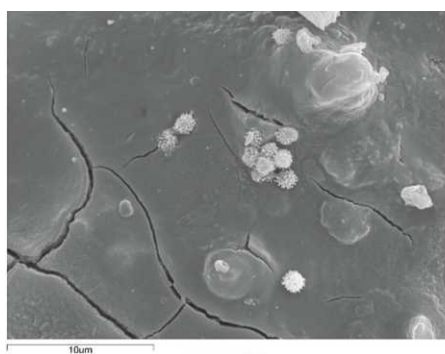


Figura 69

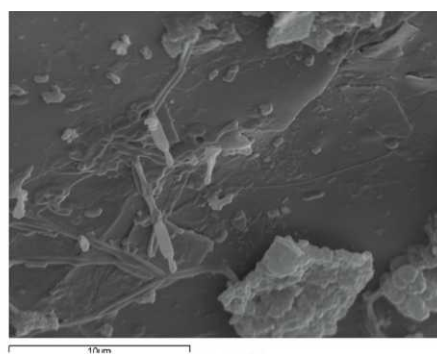


Figura 70

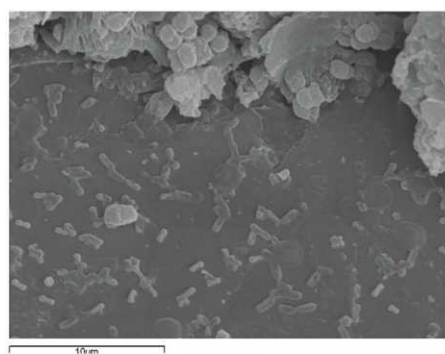


Figura 71

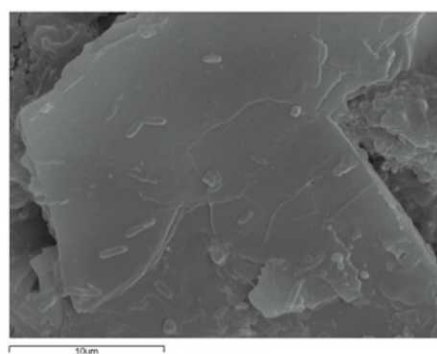


Figura 72

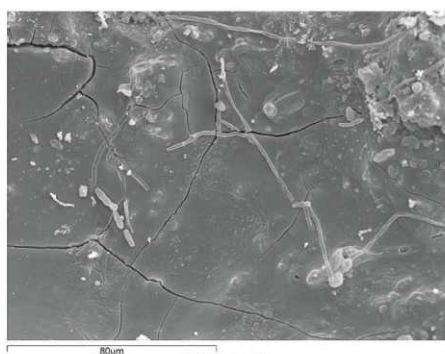


Figura 73

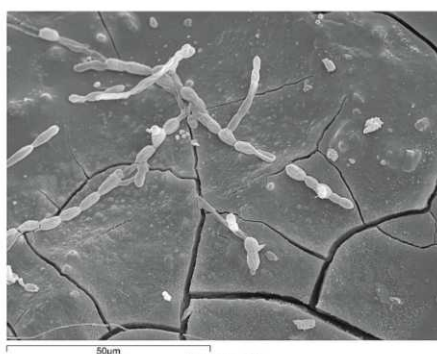


Figura 74

Figuras 69-74: 69. Bacterias creciendo en y sobre el ópalo A rico en silicio. Gundaring (Australia). 70. Bacterias creciendo en y sobre el ópalo A. Bodagrottor (Suecia). 71. Bacterias creciendo sobre el ópalo A. Bodagrottor (Suecia). 72. Bacterias creciendo sobre el ópalo A rico en silicio. Hölick Grottan (Suecia). 73-74. Bacterias creciendo sobre el ópalo A rico en silicio. Gundaring (Australia). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

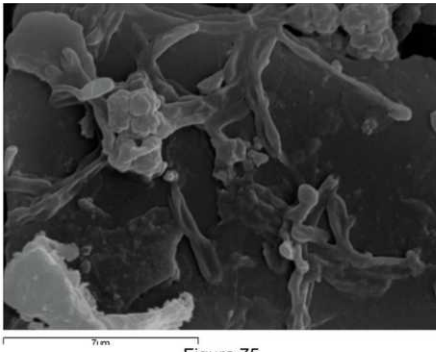


Figura 75

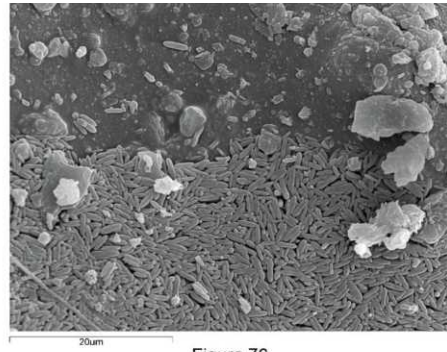


Figura 76

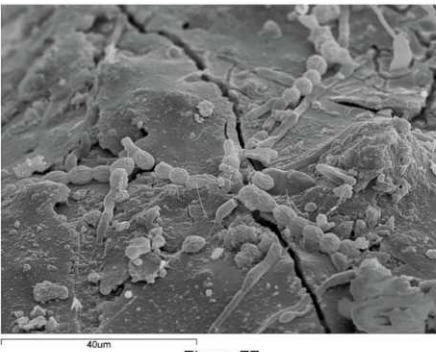


Figura 77

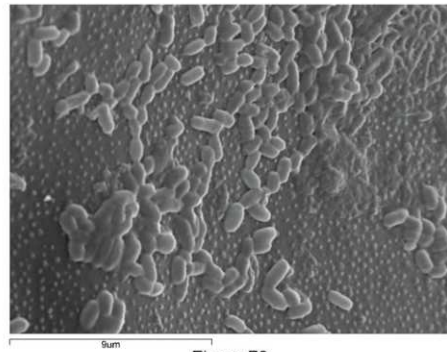


Figura 78

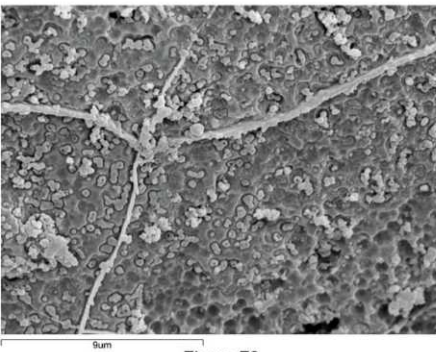


Figura 79

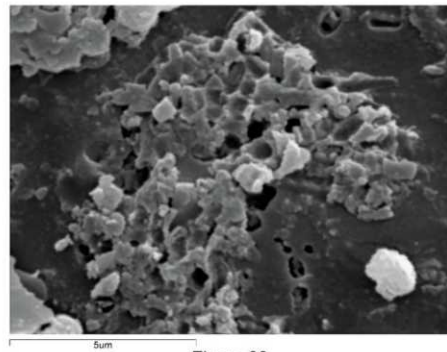


Figura 80

Figuras 75-80: 75. Bacterias creciendo sobre el ópalo A rico en silicio. Pampa de Achala, Córdoba, Argentina. 76-77. Bacterias creciendo sobre el ópalo A rico en silicio. Gundaring (Australia). 78. Bacterias cocobacilos creciendo sobre la superficie de ópalo A. Porteliña (Galicia, España). 79. Huellas de las bacterias que crecían en el hidrogel de silicio. Castelo da Furna (Portugal). 80. Huellas de las bacterias que crecían en el hidrogel de silicio. Gobholo (África). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

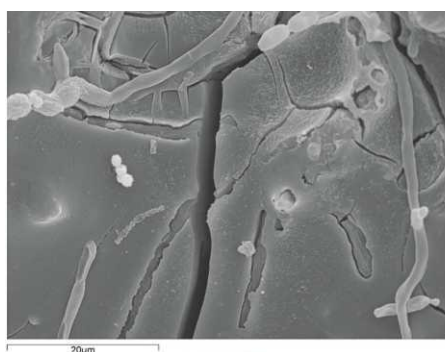


Figura 81

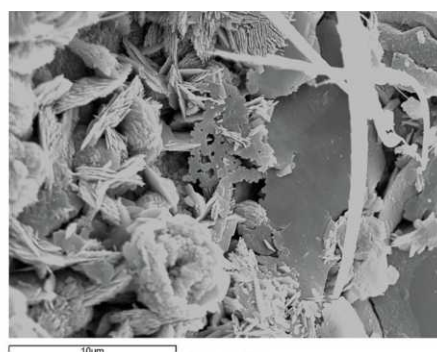


Figura 82

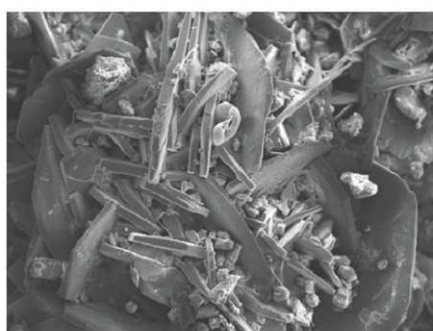


Figura 83

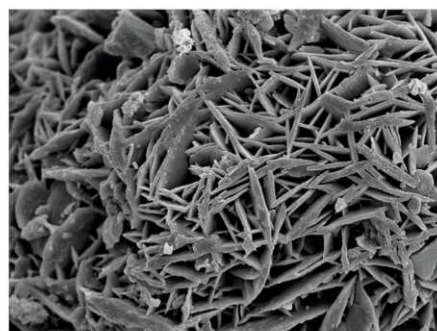


Figura 84

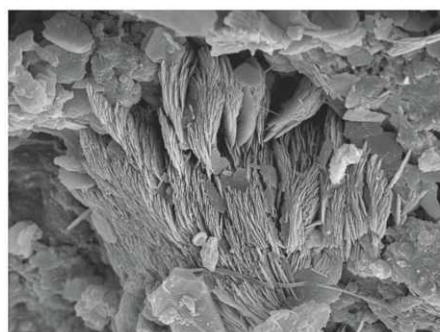


Figura 85

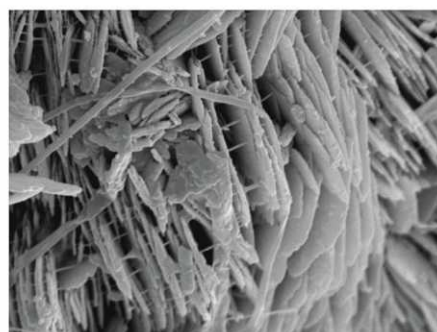


Figura 86

Figuras 81-86: 81. Huellas de organismos en el ópalo precipitado. Gundaring (Australia). 82. Drusa de yeso parcialmente recubierta por una capa de ópalo A producida por una nueva etapa lluviosa. 83. Maclas de yeso formando una drusa en el extremo terminal del espeleotema. Ávila (España). 84, 86. Maclas de yeso formando una drusa en el extremo terminal del espeleotema. Pampa de Achala (Córdoba, Argentina) (Vidal Romaní, J.R.). 85. Maclas ramosas formadas por microcristales aciculares de malaquita en el seno del espeleotema. Pampa de Achala (Argentina) (Vidal Romaní, J.R.). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

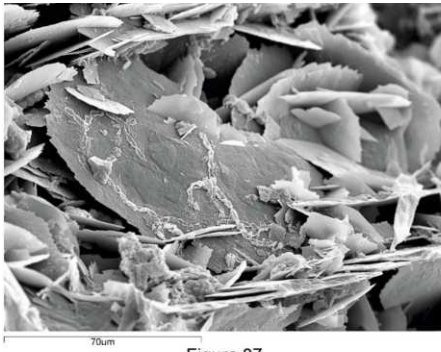


Figura 87

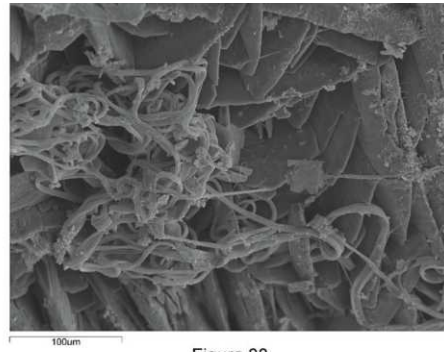


Figura 88

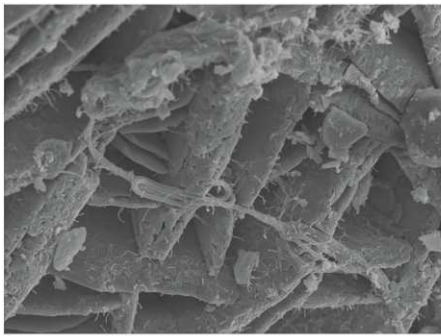


Figura 89

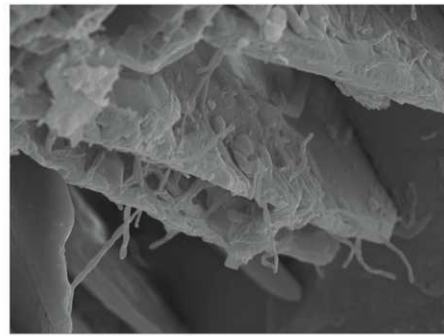


Figura 90

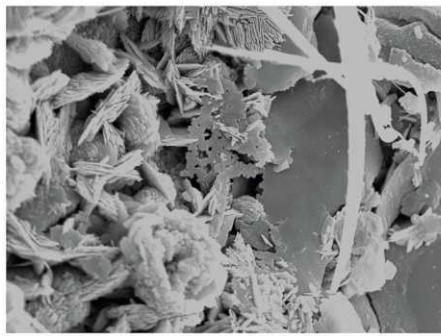


Figura 91

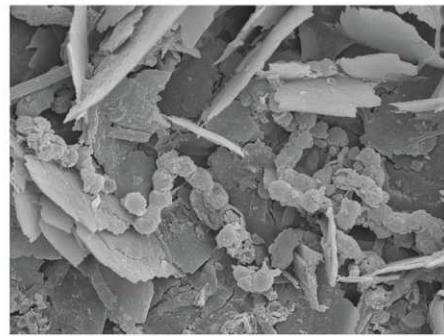


Figura 92

Figuras 87-92: Maclas de yeso formando una drusa en el extremo terminal del espeleotema. Castelo da Furna (Portugal). 88. Bacterias filamentosas creciendo sobre las maclas de yeso. Drömgrottan (Suecia). 89. Bacterias filamentosas creciendo sobre las maclas de yeso. Drömgrottan (Suecia). 90. Bacterias filamentosas creciendo sobre las maclas de yeso. Drömgrottan (Suecia). 91. Drusa de yeso parcialmente recubierta por una capa de ópalo A producida por una nueva etapa lluviosa. 92. Maclas de yeso colonizadas por bacterias. Castelo da Furna (Portugal). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

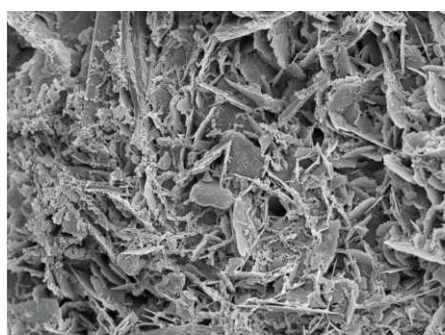


Figura 93

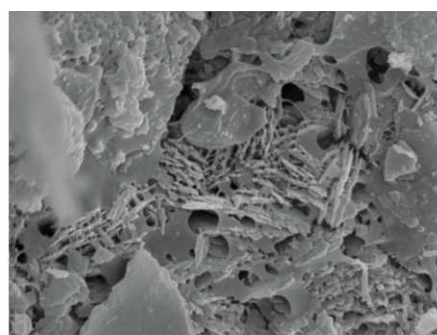


Figura 94

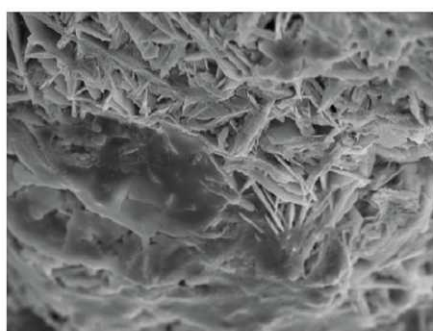


Figura 95

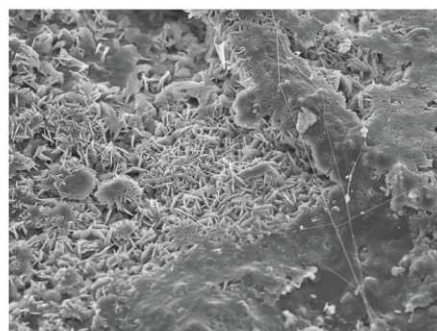


Figura 96

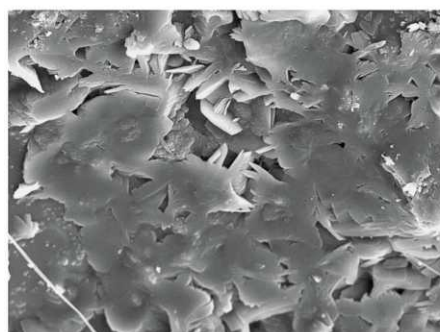


Figura 97



Figura 98

Figuras 93-98: 93. Maclas de yeso colonizadas por bacterias. Castelo da Furna (Portugal). 94. Maclas de yeso formando una drusa en el extremo terminal del espeleotema. Pampa de Achala (Argentina) (Vidal Romaní, J.R.). 95. Ópalo A sepultando las maclas de yeso. El Zapato (Argentina) (Vidal Romaní, J.R.). 96-97. Ópalo A sepultando las maclas de yeso. Ávila (España) (Vidal Romaní, J.R.). 98. Ópalo A sepultando las maclas de yeso. Las Jaras (Córdoba, España). (Vidal Romaní, J.R.).

	C1 SILVA	C1 Gg	C2 SILVA	C2 Gg	C3 SILVA	C3 Gg	A1 SILVA	A1 Gg	A2 SILVA	A2 Gg	A3 SILVA	A3 Gg	A4 SILVA	A4 Gg
<i>Acidobacteria</i>	14,455	13,372	0,142	0,138	10,555	10,445	0,556	1,199	5,337	6,705	8,006	8,997	21,640	22,418
<i>Actinobacteria</i>	55,754	61,357	91,192	92,921	40,899	41,606	27,475	11,978	51,898	46,661	36,860	33,171	48,847	44,045
<i>AD3</i>					0,040	0,032					0,045	0,024		0,011
<i>Armatimonadetes</i>					0,227	0,021	0,207	0,125	0,045	0,012	0,711	0,525	0,042	0,042
<i>Bacteroidetes</i>	0,294	0,241	0,036	0,018							0,012			
<i>BD1-5</i>											0,675	0,717	0,191	0,133
<i>Chlamydiae</i>	0,069	0,062	0,021	0,007	0,020	0,018	0,323	0,673	0,454	0,471				
<i>Chlorobi</i>					0,010	0,009								
<i>Chloroflexi</i>	1,284	1,193	0,065	0,063	12,416	10,982	0,017	0,052	0,167	0,151	2,661	3,07	1,204	0,964
<i>Cyanobacteria</i>	0,026	0,017	0,056	0,037	0,280	0,171	31,049	11,413	0,124	0,136	0,250	0,28	0,075	0,074
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,007				0,003									
<i>Elusimicrobia</i>					0,003	0,002								
<i>Euryarchaeota</i>							0,012							
<i>FBP</i>												0,015		
<i>FCPU426</i>												0,018		0,004
<i>Firmicutes</i>	0,091	0,042	0,243	0,114	0,148	0,783	1,264	1,634	0,494	0,274	4,302	1,701	0,116	0,429
<i>Fusobacteria</i>			0,006	0,002							0,113	0,071	0,003	0,002
<i>GAL15</i>						0,002								
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,288	0,205	0,015	0,009	0,102	0,1	0,017	0,034			0,386	0,445	0,072	0,02
<i>GN02</i>											0,012			
<i>Nitrospirae</i>	0,382	0,171		0,004	1,307	1,57		0,004		0,345	0,033	2,282	0,863	3,334
<i>NPL-UPA2</i>											0,003			
<i>OD1</i>	0,010	0,011							0,009	0,012	0,137	0,171	0,003	0,396
<i>OP3</i>												0,006		
<i>Planctomycetes</i>	2,382	2,221	0,597	0,817	2,411	1,771			0,524	0,456	1,171	1,02	1,828	1,854
<i>Proteobacteria</i>	19,794	15,992	6,768	5,041	16,308	16,451	38,934	72,564	24,568	25,759	43,249	45,639	23,593	25,156
<i>SHA-109</i>					0,010									
<i>SM2F11</i>											0,006			
<i>Spirochaetae</i>											0,021	0,029		
<i>TA06</i>					0,013									
<i>Tenericutes</i>											0,006	0,006		
<i>Thaumarchaeota</i>					0,063						0,003		0,009	
<i>Thermi</i>		0,006												
<i>TM6</i>	0,010	0,008			0,003	0,005	0,003	0,004	0,061	0,08	0,125	0,159	0,024	0,018
<i>TM7</i>	0,131	0,121	0,831	0,759	0,122	0,123		0,004	14,733	16,714	0,389	0,51	0,006	0,006
<i>Verrucomicrobia</i>	4,764	4,791			0,020	0,011	0,017	0,056			0,172	0,198	0,006	0,006
<i>WCHB1-60</i>					0,007						0,042			
<i>WD272</i>	0,144		0,024		14,645				1,533		0,529		0,938	
<i>WPS-2</i>		0,16		0,061		15,812				2,12		0,867		1,065
<i>No Relative</i>	0,114	0,028	0,003	0,009	0,389	0,023	0,125	0,241	0,055	0,102	0,095	0,059	0,541	0,018
<i>Archaea_Crenarchaeota</i>					0,053							0,029		0,006
<i>Archaea_Euryarchaeota</i>							0,017							

Figuras 99. Abundancia de los diferentes filos de bacteria y arqueas encontrados según dos métodos bioinformáticos diferentes aplicados.

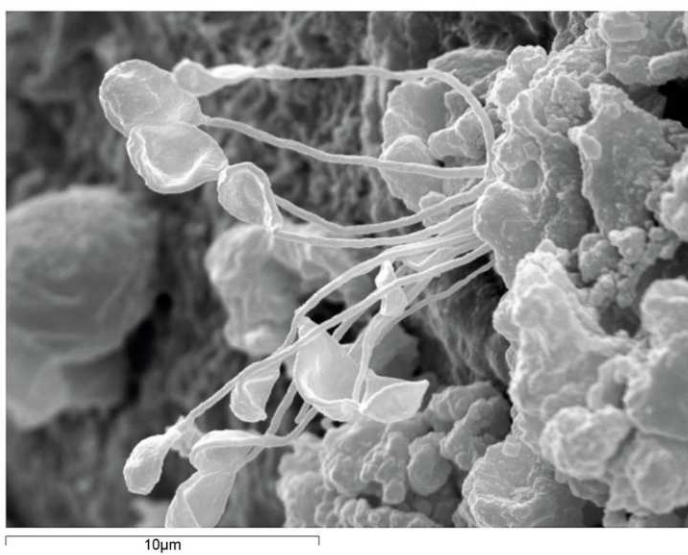


Figura 100

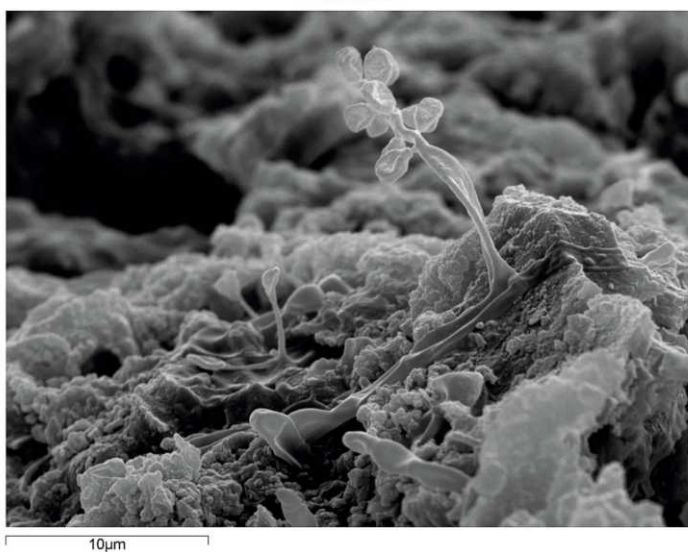


Figura 101

Figuras 100-101: Posibles Mixobacterias. Castelo da Furna (Portugal). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

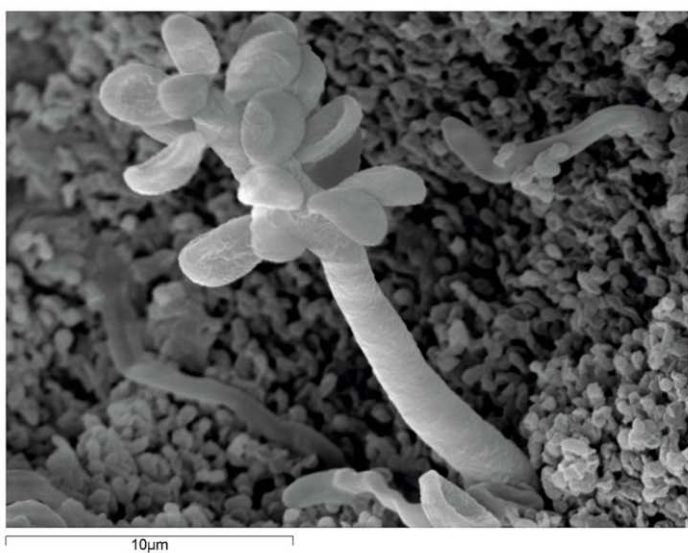


Figura 102



Figura 103

Figuras 102-103: 102. Posible mixobacteria Castelo da Furna (Portugal). 103. Posibles Mixobacterias, Alto de Barruecos (Extremadura, España). (Fotos Vidal Romani, J.R.).

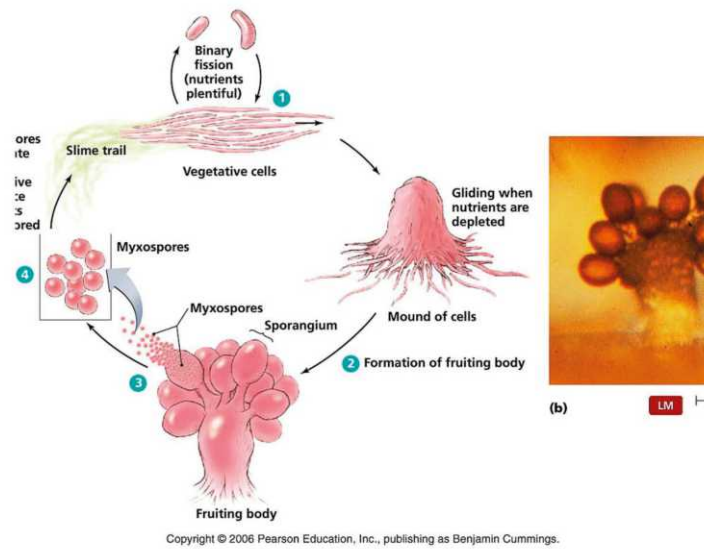


Figura 104

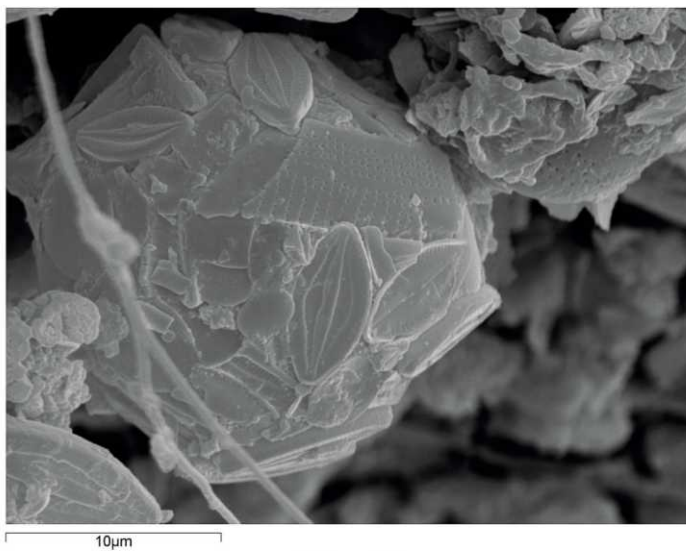


Figura 105

Figuras 104-105: 104. Ciclo de vida de Mixobacterias. 105. Diatomeas formando las testas de amebas testáceas, Albarellos (Galicia, España). (Fotos Vidal Romani, J.R.).

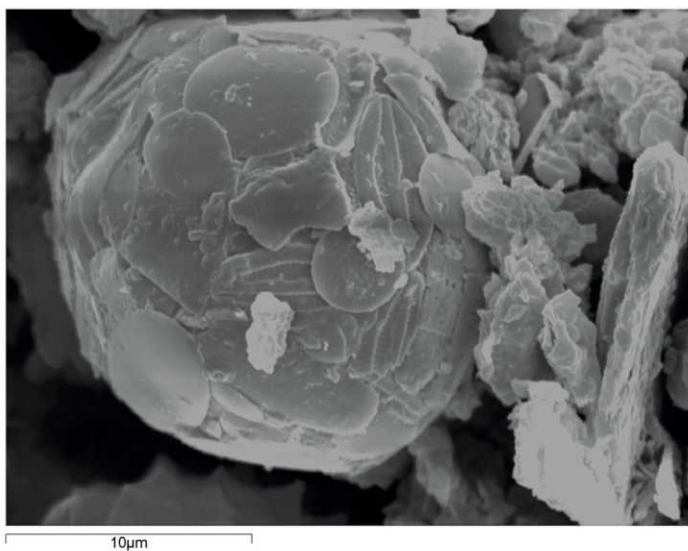


Figura 106

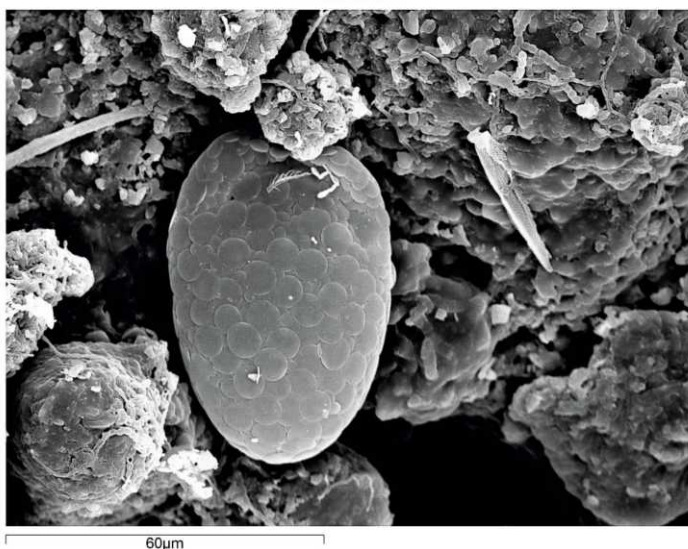


Figura 107

Figuras 106-107: Diatomeas formando las testas de amebas testáceas, Albarellos (Galicia, España). 107. Quiste de ameba testácea con tapón en el pseudostoma, A Trapa (Galicia, España). (Fotos Vidal Romani, J.R.).

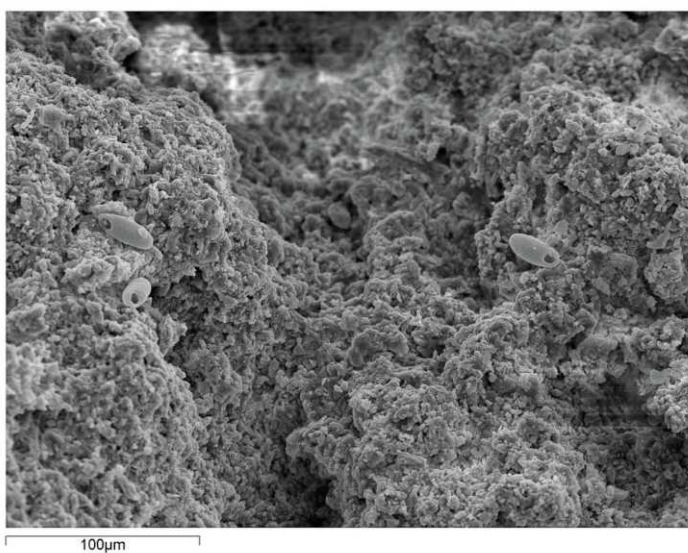


Figura 108

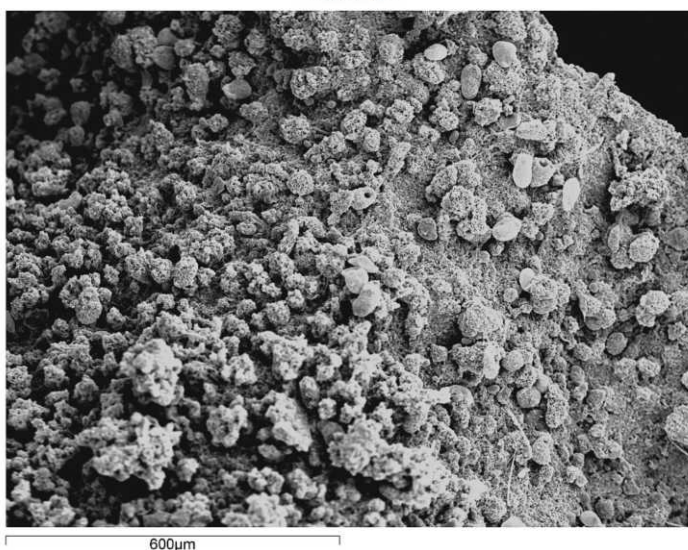


Figura 109

Figuras 108-109: Amebas sobre espeleotema, Trollh llet (Suecia). 109. Amebas sobre espeleotema, A Trapa (Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

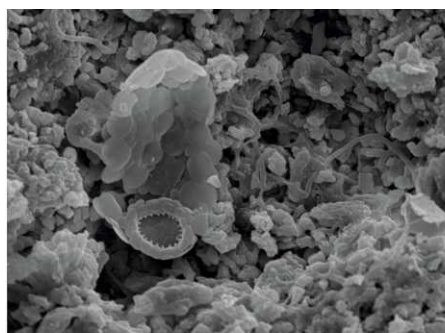


Figura 110

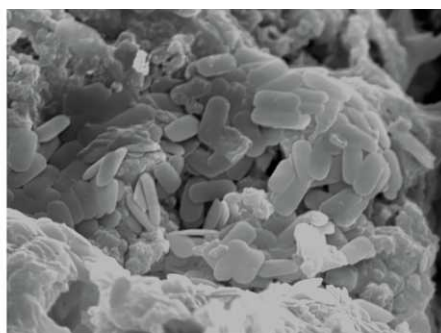


Figura 111

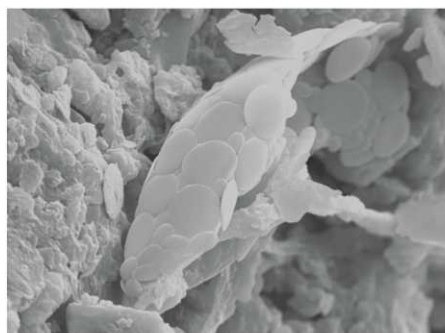


Figura 112

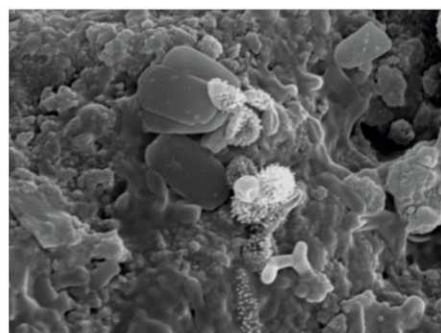


Figura 113

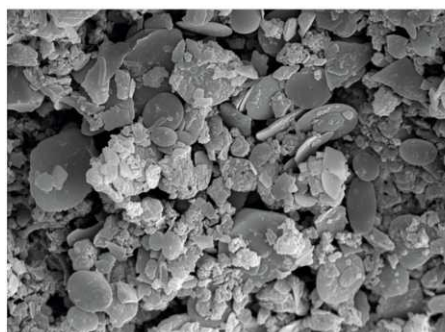


Figura 114

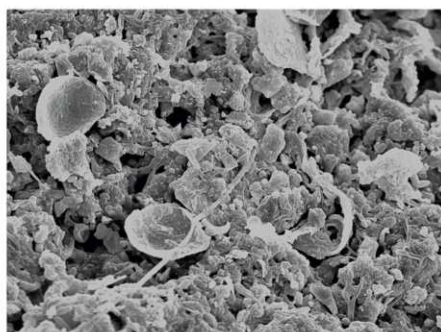


Figura 115

Figuras 110-115: 110. Testa de ameba integrándose en el sustrato, Trollhålet (Suecia). 111. Testa de ameba integrándose en el sustrato, Castelo da Furna (Portugal). 112. Testa de ameba integrándose en el sustrato, Las Jaras (Córdoba, España). 113-114. Idiosomas de testa de ameba integrándose en el sustrato. 115. Testas integrándose en el sustrato, Austria. (Fotos Vidal Romani, J.R.).

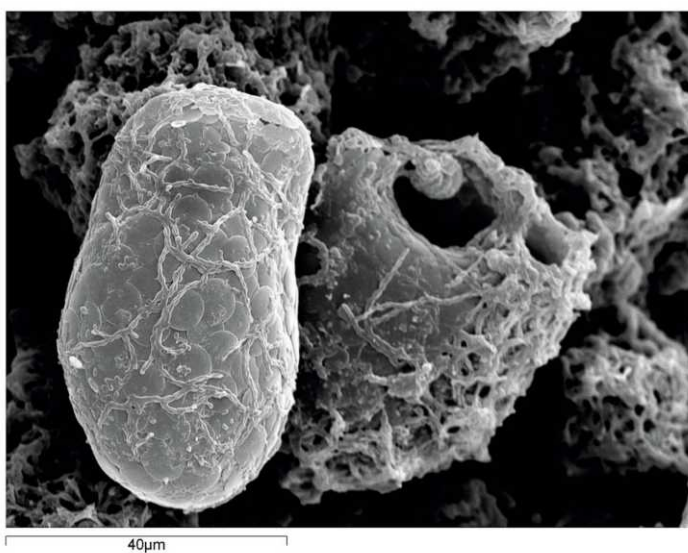


Figura 116

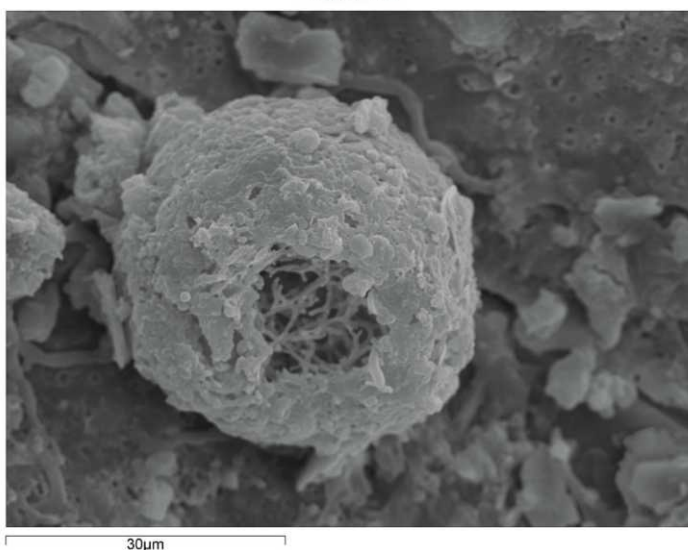


Figura 117

Figuras 116-117: 116. Amebas sobre espeleotema recubiertas por bacterias filamentosas, A Trapa (Galicia, España). 117. *Cyclopyxis eurystoma*, Castelo da Furna (Portugal) con bacterias simbióticas en su interior. (Fotos Vidal Romani, J.R.).



Figura 118

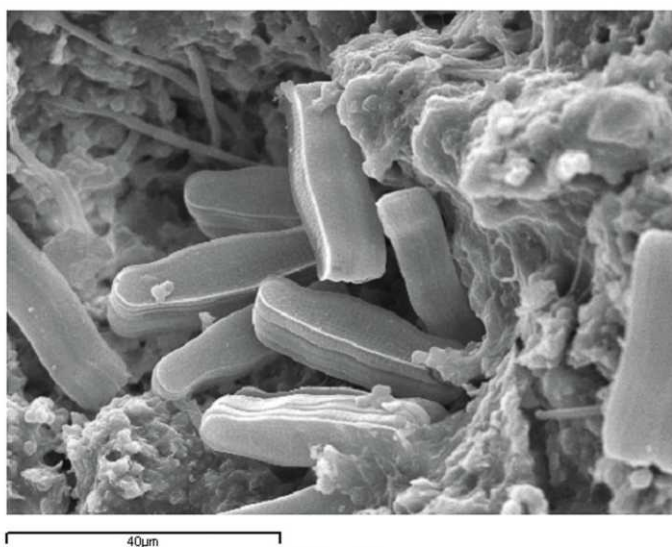


Figura 119

Figuras 118-119: 118. Colonia lineal de diatomeas centrales, Morcegos (Galicia, España). 119. *Achnanthes* sp., Ávila (España) (Vidal Romaní J.R.).

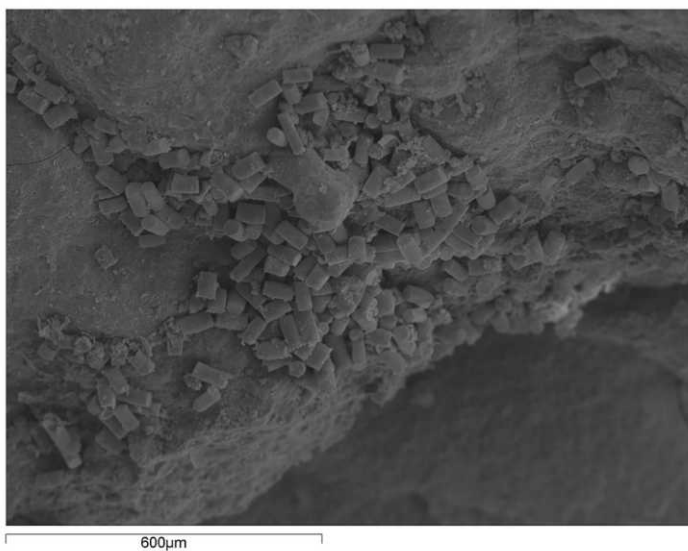


Figura 120

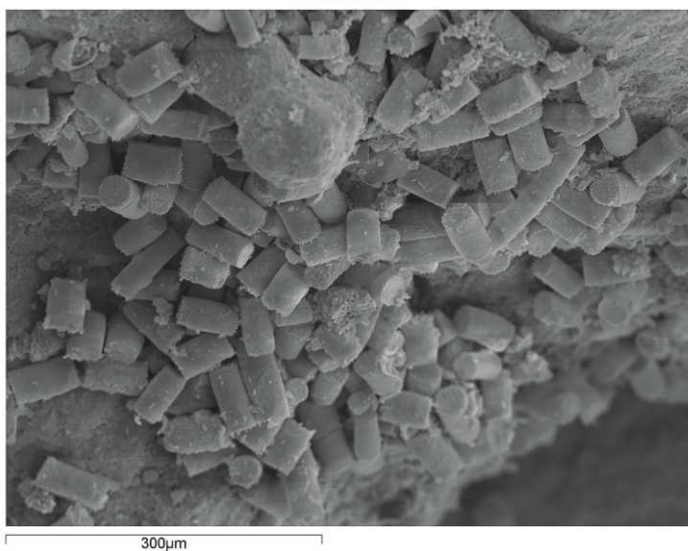


Figura 121

Figuras 120-121: Colonia de diatomeas, Albarellos (Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).

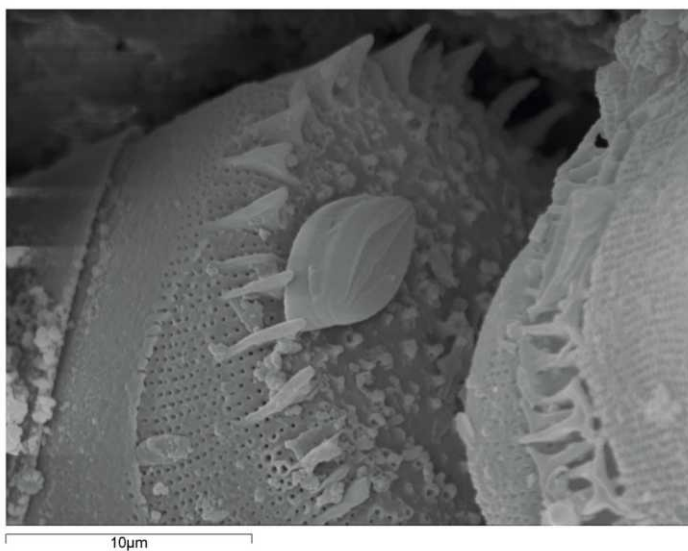


Figura 122

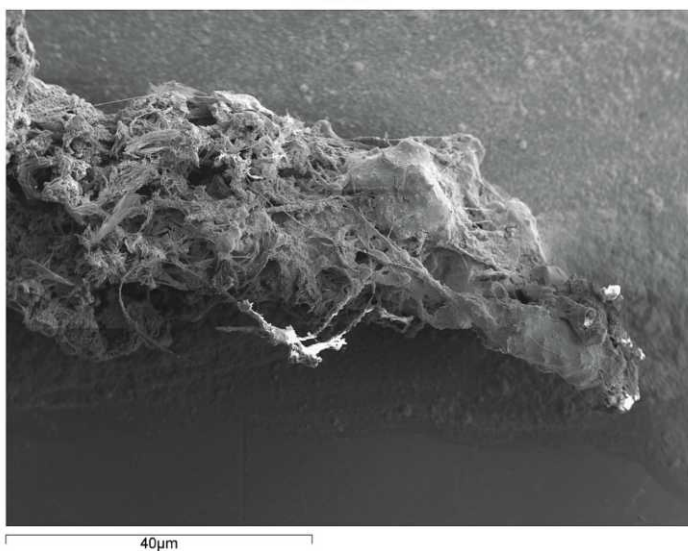


Figura 123

Figuras 122-123: 122. Diatomeas con tamaños diferentes, Albarellos (Galicia, España). 123. Mudas de colémbolos sobre y formando parte de los espeleotemas. A Cunchosa (Galicia, España). (Fotos Vidal Romaní, J.R.).



Figuras 124. Ácaro en movimiento sobre la superficie de un espeleotema (Peña del Hierro, Huelva, España).

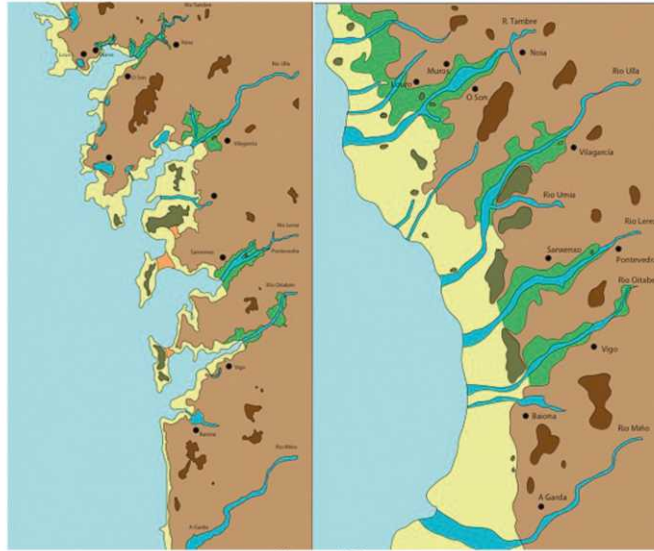


Figura 125

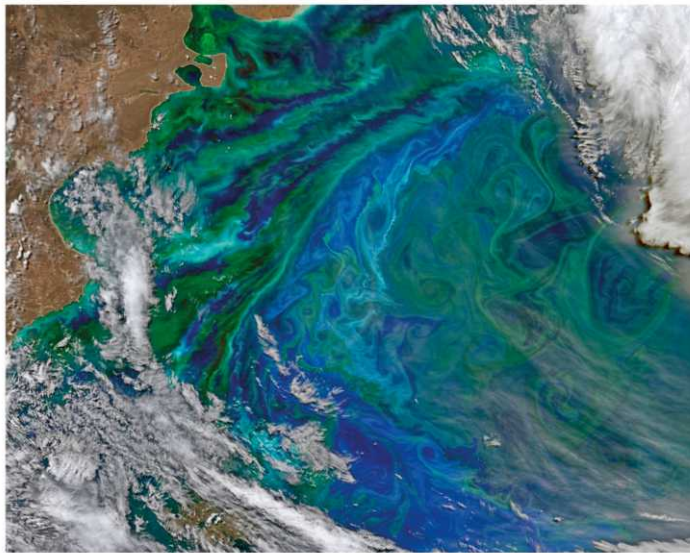


Figura 126

Figuras 125-126: 125. Costas de Galicia en diferentes momentos del proceso de construcción de la costa y formación de las Rías Baixas debido al proceso de transgresión y regresión marina hace 30000 y 50000 años respectivamente (Vidal Romaní J.R). 126. *Upwelling de plancton en aguas de la Patagonia tomada por Nasa Earth Observatory (2 diciembre 2014).*

Capítulo 6

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Tras la aplicación de la metodología descrita en el capítulo 3 se ha logrado obtener una amplia perspectiva sobre la biota que habita las cuevas de rocas graníticas, su efecto en la meteorización de la roca y en la formación de los bioespeleotemas. Las principales conclusiones son:

1. Los resultados de esta tesis amplían el conocimiento, casi inexistente, de la microbiología presente en cuevas de rocas magmáticas.
2. Pese a que las cuevas son ambientes oligotrofos y, por ello extremos para la vida, existe una gran diversidad bacteriana (dominando las Actinobacterias). Aproximadamente el doble de lo descrito para cuevas en rocas de caliza.
3. La gran diversidad de microorganismos hace que sea un microecosistema estable y que se mantenga en el tiempo y espacio.
4. Las asociaciones de organismos en los espeleotemas aparecen de forma homogénea a lo largo de todo el Mundo.
5. La relación entre la formación y evolución de este tipo de bioespeleotemas, tanto en su fábrica y estructura como en morfología y mineralogía, está determinada por la disponibilidad de agua, aunque sea en pequeñas cantidades y durante breves episodios de tiempo, y en consecuencia del crecimiento de los microorganismos.
6. Se pone en evidencia que las bacterias son las principales responsables de la formación del biomineral típico de los bioespeleotemas (ópalo A).
7. El método de trabajo planteado, basado en estudios al microscopio electrónico de barrido (SEM) y pirosecuenciación, a partir de muestras geológicas y muy pequeñas produce mejores y más completos resultados sobre los habitualmente utilizados en la bibliografía.
8. Los datos de secuencia obtenidos a partir de sedimentos, demuestran la posibilidad de realizar, con éxito, estudios genéticos en materiales "fósiles" por la naturaleza biológica de estos bioespeleotemas, en contraposición al resto de espeleotemas estudiados en cuevas.
9. Las cuevas estudiadas actúan como reservorio y protección de especies amenazadas, pero también son fuente de nuevas especies de diferentes microorganismos, algunos capaces de excretar multitud de biomoléculas con nuevas aplicaciones biotecnológicas.
10. Los resultados respecto a la biodiversidad bacteriana existente en las cuevas, establecen a estas como un ambiente análogo para estudiar formas de vida primitiva en otros planetas o lunas.

Capítulo 7

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulla, H. (2009) Bioweathering and biotransformation of granitic rock minerals by actinomycetes. *Microbial ecology*, 58, 753-761. DOI: [10.1007/s00248-009-9549-1](https://doi.org/10.1007/s00248-009-9549-1)
- Allwood, A.C., D. Beaty, D. Bass, C. Conley, K. Kminek, M. Race, S. Vance & Westall, F. (2013) Conference Summary: Life Detection in Extraterrestrial Samples. *Astrobiology* 13, 203-216. DOI: [10.1089/ast.2012.0931](https://doi.org/10.1089/ast.2012.0931)
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215(3), 403-410. DOI:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Álvarez Blanco, I. (2008) Análisis de calidad de las aguas de los ríos de la Cuenca hidrográfica del Duero utilizando índices diatomológicos. Tesis de licenciatura. Universidad de León, León, 146 pp.
- Anderson, C.A. (1930) Opal stalactites and stalagmites from a lava tube in northern California. *American Journal of Science*, 20, 22-26. DOI: [10.2475/ajs.s5-20.115.22](https://doi.org/10.2475/ajs.s5-20.115.22)
- Aoki, Y., hoshina, M. and Matsubara, T. (2007) Silica and testate amoebae in a soil under pineoak forest. *Geoderma*, 142: 29–35.
- Arbea, J.I. & Baena, M. (2003) Colémbolos cavernícolas de Andalucía (Insecta: Collembola): *Zoologica Baetica*, 13-14: 71-84.
- Arbea, J, I. (2005) *Agraphorura calvoi* n. sp. from Venezuelan caves (Collembola: Onychiuridae). *International Journal of Speleology*, 34 (1-2), 19-24.
- Arp, G., Reimer, A., and Reitner, J. (1999) Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes. *European Journal of Phycology*, 34, 393-403.
- Ashmole, N. P. & Ashmole, M. J. (1997) The land fauna of ascension island: New data from caves and lava flows, and a reconstruction of the prehistoric ecosystem.

Journal of Biogeography, 24(5), 549-589. DOI: [10.1111/j.1365-2699.1997.tb00070.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1997.tb00070.x)

Aubrecht R., Barrio-Amorós C.L., Breure A.S.H., Brewer-Carías C., Derka T., Fuentes-Ramos O.A., Gregor M., Kodada J., Kováčik L., Lánczos T., Lee N.M., Liščák P., Schlögl J., Šmída B. & Vlček L. (2012) Venezuelan tepuis: their caves and biota. Acta Geologica Slovaca – Monograph, Comenius University, Bratislava, 168 s.

Aubrecht, R., Brewer-Carías, C., Šmída, B., Audy, M., Kováčik, L. (2008) Anatomy of biologically mediated opal speleothems in the World's largest sandstone cave: Cueva Charles Brewer, Chimantá Plateau, Venezuela. Sediment.Geol. 203(3-4), 181-195. DOI: [10.1016/j.sedgeo.2007.10.005](https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2007.10.005)

Audra, P.h., Mocochain, L., Bigot, J. Y. & Nobécourt, J. C. (2009) The association between bubble trails and folia: a morphological and sedimentary indicator of hypogenic speleogenesis by degassing, example from Adaouste Cave (Provence, France). International Journal of Speleology, 38 (2), 93-102. Bologna (Italy). DOI: [10.5038/1827-806X.38.2.1](https://doi.org/10.5038/1827-806X.38.2.1)

Bamforth, S. S. and Lousier, J. D. (1995) Protozoa in tropical litter decomposition. In Soil Organisms and Litter Decomposition in the Tropics (ed. M. V. Reddy). Westview Press, pp. 59-74.

Baker, V.R., Strom, R.G., Gulick, V.C., Kargel, J.S., Komatsu, G., Kale, V.S. (1991) Ancient oceans, ice sheets and the hydrological cycle on Mars. Nature 352, 589–594.

Banfield, J.F. & Nealson, K. H. (1997) Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals, Reviews in Mineralogy 35:448 p. Mineralogical Society of America, Washington, DC.

Baquero, E., Herrando-Pérez, S., Jordana, R. (2005) A new species of Arrhopalites (Collembola, Symphypleona, Arrhopalitidae) from a cave on the Central East Iberian Peninsula. Subterranean Biology, 3: 81-86.

Barber, A., Siver, P. A., Karis, W. (2013) Euglyphid testate amoebae (rhizaria: Euglyphida) from an arctic eocene waterbody: Evidence of evolutionary stasis in

- plate morphology for over 40 million years. *Protist*, 164(4), 541-555. DOI: [10.1016/j.protis.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.001)
- Barker, W.W., Welch, S.A., Chu, S. & Banfield, J.F. (1998) Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist*, 83, 1551-1563.
- Barton, H. A. (2006) Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68(2), 43-54.
- Barton, H.A., (2013) Biospeleogenesis. In: Shroder, J. (Editor in Chief), Frumkin, A. (Ed.), *Treatise on Geomorphology*. Academic Press, San Diego, CA, vol. 6, Karst Geomorphology, pp.38–56.
- Barton, H. A., Spear, J. R., Pace, N. R. (2001) Microbial life in the underworld: Biogenicity in secondary mineral formations. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 359-368.
- Barton, H.A., Taylor, M.R., Pace, N.R., (2004) Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment. *Geomicrobiol.J.* 21(1), 11-20.
- Barton, H. A., & Northup, D. E. (2007) Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69(1), 163-178.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Kreate, M.P., Springer, A.C., Oehrle, S.A. and Bertog, J.L. (2007) The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology*, 36, 93-104.
- Barton, H.A., Giarrizzo, J.G., Suarez, P., Robertson, C.E., Broering, M.J., Banks, E.D., Vaishampayan, P.A. and Venkateswaran, K. (2014) Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Baskar, S., Baskar, R., Lee, N., Theophilus, P. K. (2009) Speleothems from mawsmmai and krem phyllut caves, meghalaya, India: Some evidences on biogenic activities. *Environmental Geology*, 57(5), 1169-1186.

- Baskar, S., Baskar, R., Mauclait, L., and McKenzie, J.A. (2006) Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara Caves, Dehradun, India: *Current Science*, v. 90, p. 58–64.
- Baskar, S., Baskar, R. & Routh, J. (2014) Speleothems from Sahastradhara Caves in Siwalik Himalaya, India: Possible Biogenic Inputs. *Geomicrobiology Journal*, 31, 664-681.
- Baskar, S., Baskar, R., Thorseth, I.H., Ovreas, L. and Pedersen, R.B. (2012) Microbially Induced Iron Precipitation Associated with a Neutrophilic Spring at Borra Caves, Vishakhapatnam, India. *Astrobiology*, 12, 327-346.
- Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2009) Bacteria and free-living amoeba in the Lascaux cave. *Research in Microbiology*, 160(1), 38-40.
- Beaty, D., Buxbaum, K., Meyer, M., Barlow, N., Boynton, W., Clark, B., Deming, J., Doran, P.T., Edgett, K., Hancock, S., Head, J., Hecht, M., Hipkin, V., Kieft, T., Mancinelli, R., McDonald, E., McKay, C., Mellon, M., Newsom, H., Ori, G., Paige, D., Schuerger, A.C., Sogin, M., Spry, J.A., Steele, A., Tanaka, K., & Voytek, M. (2006) Findings of the Mars Special Regions Science Analysis Group. *Astrobiology* 6: 677–732.
- Bennett, P. (1991) Quartz dissolution in organic-rich aqueous systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55, 1781-1797.
- Benning, L.G., Phoenix, V.R., Yee, N. & Kornhauser, K.O. (2004) The dynamics of cyanobacterial silicification: an infrared micro-spectroscopic investigation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 743-757.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A. & Wright, G.D. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*, 7.
- Blanco, S., Cejudo-Figueiras, C., Álvarez-Blanco, I., Bécares, E., Hoffmann, L., Ector, L. (2010) Atlas de las Diatomeas de la cuenca del Duero – Diatom Atlas of the Duero Basin. Área de Publicaciones, Universidad de León, 386 pp.

- Blamey, N. J.F., Boston, P. J. and Rosales-Lagarde, L. (2016) High-resolution signatures of oxygenation and microbiological activity in speleothem fluid inclusions. *International Journal of Speleology*, 45 (3), 231-241.
- Blamont, J. (2014) A roadmap to cave dwelling on the Moon and Mars. *Advances in Space Research*, 54, 2140-2149.
- Blatt, H. & Jones, R. (1975) Proportions of Exposed Igneous, Metamorphic, and Sedimentary Rocks. *Geological Society of America bulletin*, 86, 1085-1088.
- Bobrov, A.A., Andreev, A.A., Schirrmeister, L. and Siegert, C. (2004) Testate amoebae (Protozoa: Testacealobosea and Testaceafilosea) as bioindicators in the Late Quaternary deposits of the Bykovsky Peninsula, Laptev Sea, Russia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 209, 165-181.
- Bobrov, A., Krasilnikov, P., García-Calderón, N. E. (2013) Biogeography of testate amoebae in the soils of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 22(12), 2837-2855.
- Bojanowski, C. & Trivedi, C. (2015) Vertical Microbial Community Variability of Carbonate-based Cones may Provide Insight into Formation in the Rock Record AGUFallMeeting. USA.
- Bonet F. (1929) Colémbolos cavernícolas de España. *Eos*, 5: 5-31.
- Bonin, B. (2012) Extra-terrestrial igneous granites and related rocks: A review of their occurrence and petrogenesis. *Lithos*, 153, 3-24.
- Boston, P.J., Spilde, M.N., Northup, D.E., Curry, M.D., Melim, L.A., Rosales-Lagarde, L. (2009) Microorganisms as speleogenetic agents: Geochemical diversity but geomicrobial unity. In Klimchouk, A. B. and Ford, D. C. (eds.). *Hypogene Speleogenesis and Karst Hydrogeology of Artesian Basins*. Ukrainian Institute of Speleology and Karstology, Special Paper 1, Simferopol, 280 pp.
- Boston, P.J., Spilde, M.N., Northup, D.E., Melim, L.A., Soroka, D.S., Kleina, L.G., Lavoie, K.H., Hose, L.D., Mallory, L.M., Dahm, C.N., Crossey, L.J. & Schelble, R.T. (2001) Cave biosignature suites: Microbes, minerals, and Mars. *Astrobiology*, 1, 25-55.

- Boucias, D.G., Pendland, J.C. and Latge, J.P. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1795–1805.
- Brake, S.S., Arango, I., Hasiotis, S.T. and Burch, K.R. (2014) Spatial and temporal distribution and characteristics of eukaryote-dominated microbial biofilms in an acid mine drainage environment: implications for development of iron-rich stromatolites. *Environmental Earth Sciences*, 1-18.
- Broly, P., Deville, P., Maillet, S. (2013) The origin of terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). *Evolutionary Ecology* 27: 461–476. DOI: 10.1007/S10682-012-9625-8.
- Busquets, A., Fornos, J., Zafra, F., Lalucat, J., Merino, A. and Fornós, J. (2014) Microbial communities in a coastal cave: Cova des Pas de Vallgornera (Mallorca, Western Mediterranean). *International Journal of Speleology*, 43, 205-216.
- Bustillo, M.A., Aparicio, A., Carvalho, R. (2010) Estromatolitos silíceos en espeleotemas de la Cueva de Branca Opala (Isla de Terceira, Azores). *Macla* 13:51–52.
- Caldcleugh, A., (1829) On the geology of Rio de Janeiro. *Transactions of the Geological Society*, 2, 69–72.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. (2009) BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10. DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421)
- Campbell, K.A., Lynne, B.Y., Handley, K.M., Jordan, S., Farmer, J.D., Guido, D.M., Foucher, F., Turner, S., Perry, R.S. (2015) Tracing Biosignature Preservation of Geothermally Silicified Microbial Textures into the Geological Record. *Astrobiology*. 15(10), 858-882.
- Cañaveras, J.C., Cuezva, S., Sanz-Rubio, E. & Sánchez-Moral, S. Definition of protection areas in a prehistoric art cave (Tito Bustillo cave, N Spain) (2006) In: Fort, Álvarez Buergo, Gómez-Heras y Vázquez Calvo (eds): *Heritage, Weathering and Conservation*. Taylor & Francis Group, London, 813-817.

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Tumbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat.Methods*. 7(5), 335-336.
- Carnelli, A.L., Theurillat, J. and Madella, M. (2004) Phytolith types and type-frequencies in subalpine-alpine plant species of the European Alps. *Review of palaeobotany and palynology*, 129, 39-65.
- Carrión, J.S. (coord.) (2015) Cinco millones de años de cambio florístico y vegetal en la Península Ibérica e Islas Baleares. Libro electrónico. 1025 pp.
- Carrol R. W. (1978) A special alert sounded for rare speleothems. *National Speleological Society News*, 36, 121-123.
- Cassagnau, P. (1971) Le spermatophore des Collemboles Neanuridae., *Rev. Écol. Biol. Sol*, T. VIII, 4, 1971, p.609-616.
- Cheeptham N. (2013) Advances and Challenges in Studying Cave Microbial Diversity. In Cheeptham N. (ed.) *Cave microbiomes A novel resource for Drug Discovery*. Springer Briefs in Microbiology, 1, 1-34.
- Cheeptham, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L.C., Azad, N., Donkor, K.K. and Horne, D. (2013) Cure from the cave: Volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 42 (1), 35-47.
- Chelius, M.K. and Moore, J.C. (2004) Molecular phylogenetic analysis of archaea and bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21, 123-134.
- Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciú, M., Lu, Y. and Murrell, J.C. (2009) Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *Isme Journal*, 3, 1093-1104.

- Christner B. C., Priscu J. C., Achberger A. M., Barbante C., Carter S. P., Christianson K., Michaud A. B., Mikucki J. A., Mitchell A. C., Skidmore M. L., Vick-Majors T. J. (2014) A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. *Journal Nature*, 512: 310–313.
- Clymans, W., Struyf, E., Van den Putte, A., Langhans, C., Wang, Z., Govers, G. (2015) Amorphous silica mobilization by inter-rill erosion: insights from rainfall experiments. *Earth Surf.Process.Landforms*. 40(9), 1171-1181.
- Cockell, C.S., Kelly, L.C. & Marteinson, V. (2013) Actinobacteria-An Ancient Phylum Active in Volcanic Rock Weathering. *Geomicrobiology Journal*, 30, 706-720. DOI: [10.1080/01490451.2012.758196](https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758196)
- Cockell, C.S., Olsson, K., Knowles, F., Kelly, L., Herrera, A., Thorsteinsson, T. and Marteinson, V. (2009) Bacteria in weathered basaltic glass, Iceland. *Geomicrobiology Journal*, 26, 491-507.
- Cody, A. (1980) Stalagmitic deposits in Auckland lava caves. *New Zealand Speleologica Bulletin*, 6, 337-343.
- Coombes, M., La Marca, E., Naylor, L., Piccini, L., De Waele, J. & Sauro, F. (2015) The influence of light attenuation on the biogeomorphology of a marine karst cave: A case study of Puerto Princesa Underground River, Palawan, the Philippines. *Geomorphology*, 229, 125-133. DOI: 10.1016/j.geomorph.2014.10.007
- Cortés Escobedo, C. A. (2005) Caracterización de ópalos naturales, reproducción del fenómeno de opalescencia a partir del proceso Sol-Gel y diseño de un sistema de medición de opalescencia. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Costello, E.K. and Schmidt, S.K. (2006) Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: Novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental microbiology*, 8, 1471-1486.
- Cubbon, B.D. (1976) Cave flora. In: Ford, T.D., Cullingford, C.H.D. Eds., *The Science of Speleology*. Academic Press, London, pp. 423–452.

- Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Pašić, L., Jurado, V., Hernandez-Marine, M., Serrano-Ortiz, P., Hermosin, B., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. and Saiz-Jimenez, C. (2012) The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS microbiology ecology*, 81, 281-290.
- Culver, D. C. (1982) *Cave Life: Evolution and Ecology*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Cushing, G.E., Titus, T.N., Wynne, J.J. & Christensen, P.R. (2007) THEMIS observes possible cave skylights on Mars. *Geophysical Research Letters*, 34.
- Da Gama, M. M. (1985) Collemboles cavernicoles de l'Espagne. II. (Insecta, Apterygota). *Miscellània Zoològica*, 9: 209-214.
- Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Montanari, A., Mariani, S., Kita, N., Valley, J.W. and MacAlady, J.L. (2009) A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *ISME Journal*, 3, 935-943.
- Davidova, R., & Vasilev, V. (2013) Seasonal dynamics of the testate amoebae fauna (protozoa: Arcellinida and euglyphida) in Durankulak lake (northeastern Bulgaria). *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(1), 27-36.
- Davis, K.E.R., Sangwan, P. and Janssen, P.H. (2011) Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environmental microbiology*, 13, 798-805.
- Daza Brunet, Raquel (2015) Distribución, composición y génesis (biótica/abiótica) de los espeleotemas de las cuevas volcánicas de la Isla Terceira (Azores, Portugal). Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Daza Brunet, R. and Bustillo Revuelta, M.A. (2014a) Exceptional silica speleothems in a volcanic cave: A unique example of silicification and sub-aquatic opaline stromatolite formation (Terceira, Azores). *Sedimentology*, 61, 2113-2135.
- Daza, R. & Bustillo, M.A. (2014b) Allophanic and ferric root-associated stalactites: biomineralization induced by microbial activity (Galeria da Queimada lava tube, Terceira, Azores). *Geological Magazine*. University Press 2014.

- Daza Brunet, R., Bustillo Revuelta, M. A. (2014c) Distribución, composición y génesis de espeleotemas silíceos en la cueva volcánica de Algar do Carvão: Terceira, Islas Azores, Portugal. Cuevatur. Primer Congreso Iberoamericano y Quinto Congreso Español sobre Cuevas Turísticas / Calaforra J.M. y Durán J J , eds. Aracena. 496 pág. ISBN: 978-84-617-1908-2.
- Daza Brunet, R., Bustillo Revuelta, M. A., Carvalho, M. R., Carreiro Nunes, J.C., Pacheco Pereira, F. E. (2012) Distribución, composición y génesis de depósitos silíceos en la cueva volcánica de Branca Opala (Terceira, Islas Azores). Geogaceta, 52, 131-134.
- Derewacz, D.K., McNeese, C.R., Scalmani, G., Covington, C.L., Shanmugam, G., Marnett, L.J., Polavarapu, P.L. & Bachmann, B.O. (2014) Structure and stereochemical determination of hypogeamicins from a cave-derived actinomycete. Journal of natural products, 77, 1759-1763.
- Dietz, A.S., Yayanos, A.A. (1978) Silica gel media for isolating and studying bacteria under hydrostatic pressure. Appl.Environ.Microbiol. 36(6), 966-8.
- Djanashvili, R., & Barjadze, S. (2011) A new species of the genus plutomurus yosii, 1956 (collembola, tomoceridae) from Georgian caves. Journal of Cave and Karst Studies, 73(1), 28-30.
- Dobretsov, S., Abed, R.M.M., Al Maskari, Sultan M. S., Al Sabahi, J. & Victor, R. (2011) Cyanobacterial mats from hot springs produce antimicrobial compounds and quorum-sensing inhibitors under natural conditions. Journal of Applied Phycology, 23, 983-993.
- Dupraz, C., Reid, R.P., Braissant, O., Decho, A.W., Norman, R.S. & Visscher, P.T. (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. Earth-Science Reviews, 96, 141-162.
- Engel, A. S. (2011) Karst Ecosystems. In Reitner, J. and Thiel, V. (eds.) Encyclopedia of Geobiology. Springer Science + Business Media B. V. Netherlands, 521-531.
- Engel, A.S. (2010a) Microbial Diversity of Cave Ecosystems. In: Barton L. *et al* (eds) Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective. Springer Science and Business Media B.V, The Netherlands, 219-238.

- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Payn, R.A., Schmid, M., Stern, L.A., Schleifer, K.H., Lee, N.M. (2010b) Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *ISME Journal*, 4(1), 98-110.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., Bennett, P.C. (2004) Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria". *FEMS Microbiol.Ecol.* 51(1), 31-53.
- Epure, L., Muntean, V., Constantin, S. and Moldovan, O.T. (2017) Ecophysiological groups of bacteria from cave sediments as potential indicators of paleoclimate. *Quaternary International*, 432, 20-32.
- Epure, L., Meleg, I. N., Munteanu, C., Roban, R. D., Moldovan, O. T. (2014) Bacterial and fungal diversity of quaternary cave sediment deposits. *Geomicrobiology Journal*, 31(2), 116-127.
- Falasco, E., Ector, L., Isaia, M., Wetzel, C.E., Hoffmann, L. & Bona, F. (2014) Diatom flora in subterranean ecosystems: A review. *International Journal of Speleology*, 43, 231-251. DOI: <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.43.3.1>
- Felderhoff, K. L., Bernard, E. C., Moulton, J. K. (2010) Survey of pogonognathellus börner (collembola: Tomoceridae) in the southern appalachians based on morphological and molecular data. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(4), 472-491.
- Felske, A. and Akkermans, A.D.L. (1998) Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the Verrucomicrobiales cluster in grassland soils. *Letters in applied microbiology*, 26, 219-223
- Flemming, H. & Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43, 1-8.
- Forti, P. (2001) Biogenic speleothems: an overview. *International Journal of Speleology* 30A, 39-56.

- Frampton, M.B. and Zelisko, P.M. (2009) Organosilicon biotechnology. *Silicon*, 1, 147-163.
- Franklin, S. P., Ajas, A. JR., Dewers, T. A. & Tieh, T. T. (1994) The role of carboxylic acids in albite and quartz dissolution: An experimental study under diagenetic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(20), 4259-4279.
- Frantz, C.M., Petryshyn, V.A., Marengo, P.J., Tripathi, A., Berelson, W.M. and Corsetti, F.A. (2014) Dramatic local environmental change during the early eocene climatic optimum detected using high resolution chemical analyses of Green River Formation stromatolites. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 405, 1-15.
- Frings, P.J., Clymans, W., Jeppesen, E., Lauridsen, T., Struyf, E., Conley, D.J. (2014) Lack of steady-state in the global biogeochemical Si cycle: emerging evidence from lake Si sequestration. *Biogeochemistry* 117: 255–277. DOI: [10.1007/s10533-013-9944-z](https://doi.org/10.1007/s10533-013-9944-z)
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. (2012) CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 28(23), 3150-3152. DOI:10.1093/bioinformatics/bts565
- Furukawa, Y. & O'Reilly, S.E. (2007) Rapid precipitation of amorphous silica in experimental systems with nontronite (NAu-1) and *Shewanella oneidensis* MR-1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 363-377.
- Galán, C. (1993) Fauna hypogea de Guipúzcoa: su ecología, biogeografía y evolución. *Munibe (Ciencias Naturales-Natur Zientziak)*, 45, 3-163.
- García-Sánchez, A.M., Ariza, C., Ubeda, J.M., Martín-Sánchez, P.M., Jurado, V., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jiménez, C. (2013) Free-living amoebae in sediments from the Lascaux Cave in France. *International Journal of Speleology*. 42(1), 9-13.
- Ghezzi, D.; Sauro, F.; Zowawi, H.; Hong, P.; Cappelletti, M.; Piccini, L.; Zannoni, D.; Vergara, F.; De Waele, J. H. A., (2017) Exploring the microbial diversity featuring

- the geochemical complexity of the quartz-sandstone cave Imawari Yeuta, Auyan Tepui, Venezuela, in: *Speleo 2017, 17th International Congress of Speleology (17th ICS), Speleo 2017, Sydney (Australia), 23 – 29 July 2017*
- Ghiradella, H., Simpson, S., Casas and Casas, J. (2010) Insect Cuticular Surface Modifications. In: (Anonymous), pp. 135-180. Elsevier Science & Technology, London.
- Gilbert, D., Amblard, C., Bourdier, G., Francez, A-J., Mitchell, E. A. D. (2000) Le régime alimentaire des 498 thécamoebiens (Protista, Sarcodina). *Ann Biol* 3: 57-68
- Gleeson, D.F., Williamson, C., Grasby, S.E., Pappalardo, R.T., Spear, J.R. and Templeton, A.S. (2011) Low temperature S0 biomineralization at a supraglacial spring system in the Canadian High Arctic. *Geobiology*, 9, 360-375. DOI: [10.1111/j.1472-4669.2011.00283.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00283.x)
- Gong, A.S., Bolster, C.H., Benavides, M. and Walker, S.L. (2009) Extraction and analysis of extracellular polymeric substances: Comparison of methods and extracellular polymeric substance levels in salmonella pullorum sa 1685. *Environmental Engineering Science*, 26, 1523-1532.
- González López, L., Vidal-Romaní, J. R., López Galindo, M. J., Vaqueiro Rodríguez, M., Sanjurjo Sánchez, J. (2013) First data on testate amoebae in speleothems of caves in igneous rocks. *Cadernos do Laboratorio Xeoloxico De Laxe*, 37, 37-55.
- Gorbushina, A. (2007) Life on the rocks. *Environmental microbiology*, 9, 1613-1631.
- Gradziński M., Chmiel M.J., Lewandowska A., Michalska-Kasperkiewicz B. (2010) Siliciclastic microstromatolites in a sandstone cave: role of trapping and binding of detrital particles in formation of cave deposits. *Annales Societatis Geologorum Poloniae* 80: 303-314.
- Gray, C.J. and Engel, A.S. (2013) Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. *Isme Journal*, 7, 325-337.
- Grivell, A., Jackson, J. (1969) Microbial culture preservation with silica gel. *Journal of general microbiology*. 58, 423-425.

- Guo, M., Jie, D., Liu, H., Luo, S. and Li, N. (2012) Phytolith analysis of selected wetland plants from Changbai mountain region and implications for palaeoenvironment. *Quaternary International*, 250, 119-128.
- Halliday, W. R. (1963) *Caves of Washington*. Washington Dept. of Conservation, Division of Mines and Geology, Information Circular. 40, 1-132.
- Handley, K.M., Campbell, K.A., Mountain, B.W., Browne, P.R.L. (2005) Abiotic-biotic controls on the origin and development of spicular sinter: in situ growth experiments, Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand. *Geobiology* 3 (2), 93-114.
- Hathaway, J.J.M., Sinsabaugh, R.L., Dapkevicius, M.D.L.N.E. and Northup, D.E. (2014) Diversity of Ammonia Oxidation (*amoA*) and Nitrogen Fixation (*nifH*) Genes in Lava Caves of Terceira, Azores, Portugal. *Geomicrobiology Journal*, 31, 221-235.
- Herlemann, D.P.R., Labrenz, M., Juergens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *Isme Journal*. 5(10), 1571-1579.
- Herrera A., Cockell C.S. (2007) Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *JMicrobio Meth* 70:1–12.
- Hill, C. A. & Forti, P. (1986) *Cave Minerals of the World*. National Speleological Society, Alabama, USA, 463 pp.
- Hill, C. A. & Forti, P. (1997) *Cave Minerals of the World*. 2nd ed. National Speleological Society, Huntsville, AL.
- Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., Yamamoto, H., Okamoto, S., Nakamura, Y., Terauchi, K., Omata, T., Ihara, K., Hattori, M. and Fujita, Y. (2015) Loss of cytochrome c M stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant and Cell Physiology*, 56, 334-345.
- Hirst, S. & Maulik, S. (1926) On some arthropod remains from the Rhynie chert (Old Red Sandstone). *Geological Magazine*, 63: 69-71.

- Hofmann, H.J. (1975) Stratiform Precambrian stromatolites, Belcher Island, Canada: Relations between silicified microfossils and microstructure: *American Journal of Science*, 275, 1121–1132.
- Holmes, A., Tujula, N., Holley, M., Contos, A., James, J., Rogers, P. and Gillings, M. (2001) Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental microbiology*, 3, 256–264.
- Hungate, B., A. Danin, N. Pellerin, J. Stemmler, P. Kjellander, J. Adams and J. Staley. (1987) Characterization of manganese-oxidizing (MnII–MnIV) bacteria from the Negev Desert rock varnish: implications in desert varnish formation. *Can. J. Microbiol.* 33: 39–943.
- Ivarsson, L.N., Ivarsson, M., Lundberg, J., Sallstedt, T. & Rydin, C. (2013a) Epilithic and aerophilic diatoms in the artificial environment of Kungsträdgården metro station, Stockholm, Sweden. *International Journal of Speleology*, 42, 289–297.
- Ivarsson M., Lundberg J., Ivarsson L., Sallstedt T., Scheuerer M., Wedin M. (2013b) Kungsträdgården, a granitic subway station in stockholm: its ecosystem and speleothems. In Filippi M., Bosák P. (eds). *Proceedings of the 16th International Congress of Speleology*, July 21–28, Brno, Czech Speleological Society. Praha, 2, 217–220.
- Jones, D.S., Albrecht, H.L., Dawson, K.S., Schaperdoth, I., Freeman, K.H., Pi, Y., Pearson, A. and Macalady, J.L. (2012) Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *Isme Journal*, 6, 158–170.
- Jones, B. & Peng, X. (2015) Laminae development in opal-A precipitates associated with seasonal growth of the form-genus *Calothrix* (Cyanobacteria), Rehai geothermal area, Tengchong, Yunnan Province, China. *Sedimentary Geology*, 319, 52–68.
- Jones, D.S., Lyon, E.H. and Macalady, J.L. (2008) Geomicrobiology of Biovermiculations from the Frasassi Cave System, Italy. *Journal of Cave and Karst Studies*, 70, 78–93.

- Jones, D.S., Schaperdoth, I. and Macalady, J.L. (2014) Metagenomic Evidence for Sulfide Oxidation in Extremely Acidic Cave Biofilms. *Geomicrobiology Journal*, 31, 194-204. DOI: 10.1080/01490451.2013.834008
- Jones, J.B. & Segnit, E.R. (1971) The Nature of Opal. I. Nomenclature and Constituent Phases. *Journal of the Geological Society of Australia*, 18, 57-68.
- Jordana, R. y Arbea, J.I. (1989) Clave de identificación de los géneros de Colémbolos de España (Insecta: Collembola). *Publ. Biol. Univ. Navarra, Ser. Zool.*, 19: 1-16 + 16 lám.
- Jordana, R., & Baquero, E. (2005) New species of *Pseudosinella* (Collembola, Entomobryidae) from Tesla Mountains, Burgos, Spain. *Serie Zoologica*, 29(1): 1-7.
- Jordana, R., Fadrique, F., Baquero, E. (2012) The collembolan fauna of maestrazgo caves (teruel, spain) with description of three new species. *Zootaxa*, (3502), 49-71.
- Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A. and Janssen, P.H. (2003) Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7210-7215.
- Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2010) Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology*, 39(1), 15-24.
- Kan, S.B.J., Kan, S.B.J., Lewis, R., Chen, K. and Arnold, F. (2016) Directed evolution of cytochrome c for carbon–silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science*, 354, 1048-1051.
- Kasama, T. & T. Murakami. (2001) The effect of microorganisms in Fe precipitation rates at neutral pH. *Chemical Geology*, 180, 117-128.
- Kashima, N., Teruo, I., Kinoshita, N. (1987) Diatom, contributors of coralloid speleothems, from Togawa-Sakaidani-do Cave in Miyasaki prefecture, Central Kyushu. *Japan Int. J. Spel.* 16, 95–100.

- Kieraite-Aleksandrova, I., Aleksandrovas, V. and Kuisiene, N. (2015) Down into the Earth: Microbial diversity of the deepest cave of the world. *Biologia (Poland)*, 70, 989-1002.
- Klare, H.F.T. and Oestreich, M. (2016) Teaching nature the unnatural. *Science*, 354, 970.
- Konhauser, K.O., Jones, B., Phoenix, V.R., Ferris, G., Renaut, R.W. (2004) The Microbial Role in Hot Spring Silicification. *Ambio* 33(8), 552-558.
- Konhauser, K., Phoenix, V., Bottrell, S., Adams, D. & Head, I. (2001) Microbial-silica interactions in Icelandic hot spring sinter: possible analogues for some Precambrian siliceous stromatolites. *Sedimentology*, 48, 415-433.
- Krauskopf, K.B. (1967) *Introduction to Geochemistry*. McGraw-Hill, Inc., New York, St Louis, San Francisco, Toronto, London and Sydney, 721 p.
- Krumbein, W. E. and Werner, D. (1983) The microbial silica cycle, In *Microbial Geochemistry*, p.125-157, edited by W. E. Krumbein, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 330p.
- Kumaresan, D., Wischer, D., Stephenson, J., Hillebrand-Voiculescu, A., Murrell, J.C., (2014) Microbiology of Movile Cave—A Chemolithoautotrophic Ecosystem. *Geomicrobiol.J.* 31(3), 186-193.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78:399–405.
- Lee, N. M., Meisinger, D. B., Aubrecht, R., Kovacik, L., Saiz-Jimenez, C., Baskar, S., Baskar, R., Liebl, W., Porter, M.L., Engel, A.S. (2012) Caves and Karst environments. In Bell, E.M. (ed.). *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*, CAB International, 320-344.
- Legatzki, A., Ortiz, M., Dominguez, S., Andersen, G., Neilson, J., Toomey, R., Pryor, B., Pierson, L., Maier, R. (2011) Bacterial and Archaeal Community Structure of Two Adjacent Calcite Speleothems in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Geomicrobiol.J.* 28(2), 99-117.

- Léveillé, R.J., Fyfe, W.S. & Longstaffe, F.J. (2000) Geomicrobiology of carbonate-silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. – *Chem. Geol.*, 169, 339-355.
- Li, J., Benzerara, K., Bernard, S., Beyssac, O. (2013) The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies. *Chemical Geology*, 359, 49-69.
- Li, W. & Godzik, A. (2006) Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 22(13), 1658-1659. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl158
- Liu J, Li F, Liu L, Yang K. (2017) Responses of different Collembola and mite taxa to experimental rain pulses in an arid ecosystem. *Catena*, 155,53-61.
- López-Arce, P. & García-Guinea, J. (2005) Weathering traces in ancient bricks from historic buildings. *Building and Environment*, 40, 929-941.
- López Galindo, M.J. (2013) biometeorización de rocas ígneas (Espeleotemas Silíceos desde una Perspectiva Geobiológica). Tesis Doctoral, Universidade da Coruña, A Coruña.
- López-Martínez, R., Barragán, R., Beraldi-Campesi, H. Lánczos, T. Vidal-Romaní, J.R., Aubrecht, R., Bernal Uruchurtu, J.P., Pi Puig, T. and Espinasa-Pereña R. (2016) Morphological and mineralogical characterization of speleothems from the Chimalacatepec lava tube system, Central Mexico. *International Journal of Speleology* 45(2), 111-122.
- Lousier, J. D. (1974) Effects of experimental soil moisture fluctuations on turnover rate of testate amoebae. *Soil Biol Biochem* 6:19–26.
- Lousier, J.D. (1982) Colonization of decomposing deciduous leaf litter by testacea (Protozoa, Rhizopoda): Species succession, abundance and biomass. *Oecologia* 52:381–388.

- Lowe, R., Kocielek, J.P. & Van De Vijver, B. (2013) Two new *Orthoseira* species (Bacillariophyceae) from lava tubes on Île Amsterdam and Big Island (Hawaii). *Phytotaxa*, 111, 39-52.
- Lowenstam, H.A. (1981) Minerals formed by organisms. *Science*, 211:1126-1131.
- Lukić, M., Houssin, C., Deharveng, L. (2010) A new relictual and highly troglomorphic species of tomoceridae (collembola) from a deep croatian cave. *Zookeys*, 69, 1-16.
- Lundberg, J., Ivarsson, M., Sallstedt, T., Sjöberg, R. Vidal Romaní, J.R., Dalén, L., Höglund, S. (2013) Calcite speleothems in pseudokarst Tjuv-antes grotta, Northern Sweden. In Filippi M., Bosák P. (Eds) *Proceedings of the 16th International Congress of Speleology*, July 21–28, Brno. Vol. 3, p. 479-482. Czech Speleological Society. Praha.
- Lundberg, J., McFarlane, D.A. & Brewer-Carias, C. (2010) An extraordinary example of photokarren in a sandstone cave, Cueva Charles Brewer, Chimantá Plateau, Venezuela: Biogeomorphology on a small scale. *Geomorphology*, 121, 342-357.
- Lynne, B.Y. (2015) Impact of three common post-depositional environmental settings on siliceous sinter diagenesis: An eight year experiment. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 292, 84.
- Lynne, B. & Campbell, K. (2003) Diagenetic transformations (opal-A to quartz) of low- and mid-temperature microbial textures in siliceous hot-spring deposits, Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40, 1679-1696.
- Lynne, B.Y., Campbell, K.A., Moore, J.N. & Browne, P.R.L. (2005) Diagenesis of 1900-year-old siliceous sinter (opal-A to quartz) at Opal Mound, Roosevelt Hot Springs, Utah, U.S.A. *Sedimentary Geology*, 179, 249-278.
- Macalady, J., Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Jones, D., Druschel, G. and Eastman, D. (2008) Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *The ISME Journal*, 2, 590-601.

- Man B., Wang H., Xiang X., Wang R., Yun Y. & Gong L. (2015) Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, central China. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Mannan, R. M., & Pakrasi, H. B. (1993) Dark heterotrophic growth conditions result in an increase in the content of photosystem II units in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Plant Physiology*, 103(3): 971–977.
- Marnocha, C.L. & Dixon, J.C. (2014) Endolithic bacterial communities in rock coatings from Kärkevagge, Swedish Lapland. *FEMS microbiology ecology*.
- Martín Sánchez, P., Jurado, V., Porca, E., Bastian, F., Lacanette, D., Alabouvette, C. and Saiz Jimenez, C. (2014) Airborne microorganisms in Lascaux Cave (France). *International Journal of Speleology*, 43, 295-303.
- Massoud Z. & Ellis W.N. (1977) Proposition pour une classification et une nomenclature cohérente des phanères des Collembolés européens. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 14: 163-179.
- Mata, S.A., Harwood, C.L., Corsetti, F.A., Stork, N.J., Eilers, K., Berelson, W.M. & Spear, J.R. (2012) Influence of gas production and filament orientation on stromatolite microfabric. *Palaos*, 27, 206-219.
- Mazei, Yu., Belyakova, O., Trulova, A., Guidolin, L., Coppellotti O. (2012) Testate amoebae communities from caves of some territories in European Russia and North-Eastern Italy. *Protistology*. 7(1): 42–50.
- Meisinger, D.B., Zimmermann, J., Ludwig, W., Schleifer, K., Wanner, G., Schmid, M., Bennett, P.C., Engel, A.S. and Lee, N.M. (2007) In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental microbiology*, 9, 1523-1534.
- Melim, L.A., Northup, D.E., Spilde, M.N., Jones, B., Boston, P.J. & Bixby, R.J. (2008) Reticulated filaments in cave pool speleothems: Microbe or mineral? *Journal of Cave and Karst Studies*, 70, 135-141.

- Miller, A. Z., Pereira, M. F. C., Calaforra, J. M., Forti, P., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C. (2014) Siliceous speleothems and associated microbe-mineral interactions from an active lava tube in Easter Island (Chile). *Geomicrobiology Journal*, 31(3), 236-245.
- Mitchell, E. A. D., Charman, D. J., Warner, B. G. (2008) Testate amoebae analysis in ecological and paleoecological studies of wetlands: Past, present and future. *Biodiversity and Conservation*, 17(9), 2115-2137.
- Montano, E. and Henderson, O. (2013) Studies of Antibiotic Production by Cave Bacteria. In Cheeptham, N. (ed.) *Cave microbiomes A novel resource for Drug Discovery*. Springer Briefs in Microbiology, 1, 109-130.
- Mulec, J. (2008) Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian karst caves. *Acta carsologica*, 37, 153.
- Mulec, J., Oarga-Mulec, A., Tomazin, R. and Matos, T. (2015) Characterization and fluorescence of yellow biofilms in karst caves, southwest Slovenia. *International Journal of Speleology*, 44, 107-114.
- Nakayama, T., Kamikawa, R., Tanifuji, G., Kashiyama, Y., Ohkouchi, N., Archibald, J.M. and Inagaki, Y. (2014) Complete genome of a nonphotosynthetic cyanobacterium in a diatom reveals recent adaptations to an intracellular lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 11407-11412.
- Navas L. (1906) Neuropteros de España y Portugal. *Boletín de la Sociedad de Historia Natural de Madrid*, 5:159-167.
- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O. and Dahm, C.N. (2003) Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environmental microbiology*, 5, 1071-1086.
- Northup, D.E., Connolly, C.A., Trent, A., Peck, V.M., Spilde, M.N., Welbourn, W.C., & Natvig, D.O. (2008) The nature of bacterial communities in Four Windows Cave, El Malpais, National Monument, New Mexico, USA. *AMCS Bulletin* 19:119-125.
- Northup, D., Hathaway, J., Snider, J., Balasch, M., García, M., Enes Dapkevicius, M., Riquelme, C., Stone, F., Spilde, M., Boston, P. (2012) Life in Earth's Lava Caves:

- Implications for Life Detection on Other Planets. In Hanslmeier, A., Kempe, S., Seckbach, J. (eds.) *Life on Earth and other Planetary Bodies. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer. Netherlands, 24, 459-484.
- Northup, D. E., Hathaway, J.J.M., Snider, J.R., Moya Balasch, M., Garcia, M., Enes Dapkevicius, M. L., Riquelme Gabriel, C., Stone, F., Spilde, M. N., Boston, P. J. (2013) *Life in Earth's Lava Caves: Implications for Life Detection on Other Planets* In Hanslmeier, A., Kempe, S., Seckbach, J. (Eds) *Life on Earth and other Planetary Bodies*, Germany, 459-484.
- Northup, D. E., & Lavoie, K. H. (2001) *Geomicrobiology of caves: A review*. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 199-222.
- Northup, D.E., Melim, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E., Riquelme, C. (2011) *Lava cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: Implications for life detection on other planets*. *Astrobiology*, 11, 601-618.
- Oberender P., Bauer H., Exel T., Lundberg J. E. K., Scheuerer M., Sjöberg R. (2015) *Gobholo Cave – A Granite Cave in Swaziland*. In Urban J., Pavuza R., Pfarr C. (Eds.) *Pseudokarst commission newsletter Nachrichtenbrief International Union of Speleology*, 24.
- Ogden, C.G. (1979) *An ultrastructural study of division in Euglypha (Protozoa: Rhizopoda)*: *Protistologica*, 15, 541-556.
- Ogden, C. G. & Hedley, R. H. (1980) *An Atlas of Freshwater Testate Amoebae*. British Museum (Natural history) and Oxford University Press (London and Oxford).
- Olsson-Francis, K., Simpson, A.E., Wolff-Boenisch, D. & Cockell, C.S. (2012) *The effect of rock composition on cyanobacterial weathering of crystalline basalt and rhyolite*. *Geobiology*, 10, 434-444. DOI: [10.1111/j.1472-4669.2012.00333.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00333.x)
- Onac, B.P., Fornos, J.J., Merino, A., Gines, J. and Diehl, J. (2014) *Linking mineral deposits to speleogenetic processes in Cova des Pas de Vallgornera (Mallorca, Spain)*. *International Journal of Speleology*, 43, 143-157.
- Ortiz, M., Legatzki, A., Neilson, J.W., Fryslie, B., Nelson, W.M., Wing, R.A., Soderlund, C.A., Pryor, B.M. & Maier, R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark:*

- Metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *ISME Journal*, 8, 478-491.
- Osborn, A.R., Almabruk, K.H., Holzwarth, G., Asamizu, S., LaDu, J., Kean, K.M., Karplus, P.A., Tanguay, R.L., Bakalinsky, A.T. and Mahmud, T. (2015) De novo synthesis of a sunscreen compound in vertebrates. *Elife*, 4, e05919.
- Pacton, M., Breitenbach, S.F.M., Lechleitner, F.A., Vaks, A., Rollion-Bard, C., Gutareva, O.S., Osintcev, A.V. and Vasconcelos, C. (2013) The role of microorganisms in the formation of a stalactite in Botovskaya Cave, Siberia - paleoenvironmental implications. *Biogeosciences*, 10, 6115-6130.
- Páez Garza, C. I. (1991) Obtención y caracterización de gel de sílice para cromatografía. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey.
- Parchert, K.J., Spilde, M.N., Porras-Alfaro, A., Nyberg, A.M. & Northup, D.E. (2012) Fungal Communities Associated with Rock Varnish in Black Canyon, New Mexico: Casual Inhabitants or Essential Partners? *Geomicrobiology Journal*, 29, 752-766.
- Patterson, R.T., Roe, H.M. and Swindles, G.T. (2012) Development of an Arcellacea (testate lobose amoebae) based transfer function for sedimentary Phosphorus in lakes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 348-349, 32-44.
- Pavan, M. (1958) Relazione sulla classificazione biologica degli animali cavernicoli. *Atti VIII Congr. Naz. Speleol.*, Como 1956. En: *Rass. Speleol. It. e Soc. Speleol. It.*, Mem., 4: 217-224.
- Pasic, L., Kovce, B., Sket, B., Herzog Velikonja, B., Pasic, L., Pačič, L. and Kovčič, B. (2010) Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS microbiology ecology*, 71, 50-60.
- Pedersen, K. (1997) Microbial life in deep granitic rock. *Episodes*, 20, 7-9.
- Peng, X. & Jones, B. (2012) Rapid precipitation of silica (opal-A) disguises evidence of biogenicity in high-temperature geothermal deposits: Case study from Dagunguo hot spring, China. *Sedimentary Geology*, 257-260, 45-62.

- Pérez García, A., Mingorance, E., Del Pino, D., Romero, D., Rivera, M.E., Pino, D., Tores, J.A., Vicente, A. (2006) Long-term Preservation of *Podosphaera fusca* Using Silica Gel. *J. Phytopathol.* 154(3), 190-192.
- Phoenix, V.R., Adams, D.G. & Konhauser, K.O. (2000) Cyanobacterial viability during hydrothermal biomineralisation. *Chemical Geology*, 169, 329-338.
- Phoenix, V.R., Konhauser, K.O., Adams, D.G. (1999) Photosynthetic controls on the silicification of cyanobacteria. The Fifth International Symposium on the Geochemistry of the Earth's Surface, Abstracts. Balkema, Rotterdam.
- Phoenix, V.R. & Konhauser, K.O. (2008) Benefits of bacterial biomineralization. *Geobiology*, 6, 303-308.
- Piano, E., Bona, F., Falasco, E., La Morgia, V., Badino, G. and Isaia, M. (2015) Environmental drivers of phototrophic biofilms in an Alpine show cave (SW-Italian Alps). *Science of the Total Environment*, 536, 1007-1018.
- Piperno, D. (2006) *Phytoliths: a comprehensive guide for archaeologist and paleoecologists*, Altamira Press. Oxford.
- Pitarque J. (1906) Colémbolos de Zaragoza. *Boll. Soc. Aragonesa Cienc. Nat.*, 5: 97-100.
- Popović S., Subakov Simić G., Stupar M., Unković N., Predojević D., Jovanović J. and Ljaljević Grbić M. (2015) Cyanobacteria, algae and microfungi present in biofilm from Božana Cave (Serbia). *International Journal of Speleology*, 44 (2). Tampa, FL (USA). DOI: <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.44.2.4>
- Porter, M.L., Engel, A.S., Kane, T.C. and Kinkle, B.K. (2009) Productivity-Diversity Relationships from Chemolithoautotrophically Based Sulfidic Karst Systems. *International Journal of Speleology*, 38, 27-40.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C. (2008) Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *Journal of applied microbiology*, 104, 681-691.

- Portillo, M.C., Porca, E., Cuezva, S., Canaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Gonzalez, J. M. (2009) Is the availability of different nutrients a critical factor for the impact of bacteria on subterranean carbon budgets? *Naturwissenschaften* 96:1035–1042.
- Poulicková, A. (2008) Morphology, cytology and sexual reproduction in the aerophytic cave diatom *Luticola dismutica* (Bacillariophyceae). *Preslia*, 80, 87-99.
- Poulson, T.L. & White, W.B. (1969) The cave environment. *Science*, 165, 971-981.
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*. 28(14), 1823-1829. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts252](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252)
- Pusz, W., Ogórek, R., Uklanska-Pusz, C. and Zagodzón, P. (2014) Speleomycological research in underground Osówka complex in Sowie Mountains (Lower Silesia, Poland). *International Journal of Speleology*, 43, 27-34.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41(D1), D590-D596. DOI: [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219).
- Quick D. (1972) Cahuilla Creek Cave. *The Explorer*, April, 45-56.
- Racovitza, E.G. (1907) Essai sur les problèmes biospéologiques. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 4^a ser., 6: 371–488. [Edició Facsímil. In: Bellés X (Ed.) 2004. Assaig sobre els problemes bioespeleològics. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona]
- Raina, J., Tapiolas, D., Foret, S., Lutz, A., Abrego, D., Forêt, S., Ceh, J., Seneca, F., Clode, P., Bourne, D., Willis, B. and Motti, C. (2013) DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. *Nature*, 502, 677-680.
- Rajput, Y., Neral, A., & Biswas, J. (2014) Subterranean Depth Dependent the Modulation of Endo and Exoenzyme Secretion in *Streptomyces prasinosporus*: A Common Soil Actinomycete of India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(6), 4601-4608.

- Riquelme, C., Marshall-Hathaway, J.J., Enes-Dapkevicius, M.D., Miller, A.Z., Kooser, A., Northup, D.E., Jurdo, V., Fernandaz, O., Saiz-Jimenez, C. and Cheeptham, N. (2015a) Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers of Microbiology*, 6:1342. DOI:[10.3389/fmicb.2015.01342](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01342)
- Riquelme, C. & Northup, D. E. (2013) Microbial Ecology: Caves as an Extreme Habitat. In Cheeptham N. (ed.) *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*. SpringerBriefs in Microbiology, 1, 85-108.
- Riquelme, C., Rigal, F., Hathaway, J.J.M., Northup, D.E., Spilde, M.N., Borges, P.A.V., Gabriel, R., Amorim, I.R. and Dapkevicius, M.L.N.E. (2015b) Cave microbial community composition in oceanic islands: Disentangling the effect of different colored mats in diversity patterns of Azorean lava caves. *FEMS microbiology ecology*, 91, 1-12.
- Röling, W.F.M., Aerts, J., Patty, C.H.L., ten Kate, I., Ehrenfreund, P., Aerts, J.W. and Direito, S.O.L. (2015) The Significance of Microbe-Mineral-Biomarker Interactions in the Detection of Life on Mars and Beyond. *Astrobiology*, 15, 492-507.
- Roque, C., & Palli, L. (1996) The bornhardtts of the ridaura area (girona). [Los domos graníticos de la cuencas del Ridaura (Girona)] *Cadernos Laboratorio Xeoloxico De Laxe*, 21, 45-58.
- Rose, S., PrevotEAU, A., Elzière, P., Hourdet, D., Marcellan, A. & Leibler, L. (2014) Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature*, 505, 382-385.
- Rummel, J.D., Beaty, D.W., Jones, M.A., Bakermans, C., Barlow, N.G., Boston, P.J., Chevrier, V.F., Clark, B.C., De Vera, J.-P., Gough, R.V., Hallsworth, J.E., Head, J.W., Hipkin, V.J., Kieft, T.L., McEwen, A.S., Mellon, M.T., Mikucki, J.A., Nicholson, W.L., Omelon, C.R., Peterson, R., Roden, E.E., Sherwood Lollar, B., Tanaka, K.L., Viola, D. & Wray, J.J. (2014) A new analysis of mars "Special Regions": Findings of the second MEPAG special regions science analysis group (SR-SAG2). *Astrobiology*, 14, 887-968.
- Rusznayk, A., Akob, D.M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K.U., Neu, T.R., Frosch, T., Popp, J., Keiner, R., Geletneky, J., Katzschnmann, L., Schulze, E.-., Kusel, K. (2012) Calcite Biomineralization by Bacterial Isolates from the Recently

- Discovered Pristine Karstic Herrenberg Cave. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(4), 1157-1167.
- Saiz-Jimenez, C. (2012) Microbiological and environmental issues in show caves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7), 2453-2464.
- Sallstedt, T., Ivarsson, M., Lundberg, J., Sjöberg, R., Vidal Romaní, J.R. (2014) Speleothem and biofilm in granite/dolerite cave, Northern Sweden. *International Journal of Speleology*, 43 (3), 305-313. DOI: [10.5038/1827-806X.43.3.7](https://doi.org/10.5038/1827-806X.43.3.7)
- Sanjurjo, J., Fernández Mosquera, D., Vidal Romaní, J.R. (2006) Procesos de disolución en ambientes pseudocársticos graníticos. *Geomorfología y Territorio*. Pérez Alberti, A., López Bedoya, J. (coords), *Actas de la IX Reunión Nacional de Geomorfología*. Santiago de Compostela, 13-15 de septiembre de 2006, 773-784.
- Sanjurjo J., Vidal Romaní, J.R., Palli, L.I., Roqué, C. (2007) Espeleotemas de ópalo y pseudocarst granítico. *Cuaternario y Geomorfología*, 21 (1-2), 123-134.
- Sanjurjo-Sánchez J., Vidal Romaní J. R (2011) Luminiscence dating of pseudokarst speleothems: a first approach. *Spectroscopy letters*, t. 44, 1-6.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2002) Phylogenetic 16s rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in tito bustillo cave, Spain, and on its palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology*, 4(7), 392-400.
- Scheuerer, M., Lundberg, J.E. K., Sjöberg R. (2013) Gobholo Cave: A Long Granite Cave in Swaziland (Southern Africa) In Filippi M., Bosák P. (Eds). *Proceedings of the 16th International Congress of Speleology*, July 21–28, Brno. Volume 3, p. 499. Czech Speleological Society. Praha.
- Schiner, J. R. (1854) Fauna der Adelsberger, Lueger, und Magdalener-Grotte. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, 3: 1-40.
- Schopf, J.W., Kudryavtsev, A.B., Czaja, A.D., Tripathi, A.B. (2007) Evidence of Archean life: stromatolites and microfossils. *Precambrian Research*, 158:141–155.

- Schroeter, D. (2001) Structure and function of the decomposer food webs of forests along a European North-South-transect with special focus on testate amoebae (Protozoa). PhD-thesis, 575 Department of Animal Ecology, Universität Giessen.
- Scurfield, G., Anderson, C. A. & Segnit, E.R. (1974) Silica in woody stems. *Australian Journal of Botany*, 22: 211-229.
- Sendra, A. & Reboleira A. S. (2012) The world's deepest subterranean community - Krubera-Voronja cave (Western Caucasus). *International Journal of Speleology*, 41(2), 221-230.
- Serafeimidis, K. and Anagnostou, G. (2014) On the crystallisation pressure of gypsum. *Environmental Earth Sciences*, 72, 4985-4994.
- Service R. (2016) Researchers take small step toward silicon-based life, by *Science News*, March 18, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf4202.
- Shabarova, T. and Pernthaler, J. (2010) Karst pools in subsurface environments: collectors of microbial diversity or temporary residence between habitat types. *Environmental microbiology*, 12, 1061-1074.
- Show, S., Tamang, A., Chowdhury, T., Mandal, D., Chattopadhyay, B. (2015) Bacterial (BKH1) assisted silica nanoparticles from silica rich substrates: A facile and green approach for biotechnological applications. *Colloids Surf.B Biointerfaces*. 126, 245-250.
- Shu, S, Jiang, W, Whitten, T, Yang, J, Chen, X. (2013) Drought and China's cave species. *Science*, 340:272.
- Singh, R., Stine, O., Smith, D., Spitznagel, J., Labib, M. and Williams, H. (2003) Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3412-3420.
- Sleep, N.H. (2010) The Hadean-Archaeon environment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2.
- Southam, G. (2012) Minerals as substrates for life: The prokaryotic view. *Elements*, 8(2): 101-106.

- Spilde, M.N., Kooser, A., Boston, P.J. and Northup, D.E. (2009) *Speleosol: A subterranean soil*. Proceedings of the 15th International Congress of Speleology, Kerrville, TX.
- Stanish, L.F. and Spear, J.R. (2013) Diatom ecology and microbial mat structure and function in antarctic dry valleys. *Palaos*, 28, 267-269.
- Staudigel, H., Furnes, H., McLoughlin, N., Banerjee, N. R., Connell, L. B., and Templeton, A. (2008) 3.5 billion years of glass bioalteration: Volcanic rocks as a basis for microbial life?, *Earth-Sci. Rev.*, 89, 156–176.
- Stebaeva S.K. (1988) Systematic position and phylogeny. In Tzernova N.M. & Striganova B.R. (eds): *Manuel d'Identification des Collemboles d'URSS: Partie Generale, Cles des Familles et des Genres*. Nauka, Moscow, pp. 5-9.
- Soto-Adames, F.N., Barra, J., Christiansen, K. and Jordana, R. (2008) Suprageneric classification of Collembola Entomobryomorpha. *Annals of the Entomological Society of America*, 101, 501-513.
- Summerfield, M. A. (1991) *Global geomorphology: an introduction to the study of landforms*. Harlow: New York. Longman, 537 p.
- Sweeting M. M. (1973) *Karst landforms*. New York: Columbia. University Press, 362 p.
- Swartzlow, C.R., Keller, W.D., 1937. Coralloidal opal. *J. Geol.* 45, 101–108.
- Swindles, G.T., Amesbury, M.J., Turner, T.E., Carrivick, J.L., Woulds, C., Raby, C., Mullan, D., Roland, T.P., Galloway, J.M., Parry, L., Kokfelt, U., Garneau, M., Charman, D.J. and Holden, J. (2015) Evaluating the use of testate amoebae for palaeohydrological reconstruction in permafrost peatlands. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 424, 111-122.
- Tapia Quezada, J. M. (2010). *Fenómenos de interacción químico-biológicos del hierro en nuevos sistemas de generación de energía*. Universidad Complutense. Madrid.

- Taylor, A.P., Finnie, K.S., Bartlett, J.R. and Holden, P.J. (2004) Encapsulation of viable aerobic microorganisms in silica gels. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 32, 223-228.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Villarreal Ruiz, L. *et al.* (2014) Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. 346(6213):1256688. DOI: [10.1126/science.1256688](https://doi.org/10.1126/science.1256688)
- Teschke, O. (2005) Volume of extracellular polymeric substance coverage of individual *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacterium measured by atomic force microscopy. *Microscopy research and technique*, 67, 312-316.
- Tetu, S.G., Breakwell, K., Elbourne, L.D.H., Holmes, A.J., Gillings, M.R. & Paulsen, I.T. (2013) Life in the dark: Metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *ISME Journal*, 7, 1227-1236.
- Thanyakoo, C.; Zargar, K.; Gomez, F.; Eydal, H.; Berelson, W. M.; Dawson, S. C.; Corsetti, F.; Hanselmann, K.; Johnson, H.; Spear, J.; Stevenson, B. S.; de La Torre, J. (2008) A silica budget reveals much about how bacteria might regulate the formation of silica stromatolites in YNP Hot Springs. American Geophysical Union, Fall Meeting.
- Thatcher, R.C. & Weaver, T.L. (1974) Simplified method for the preparation of silica gel media. *Appl. Microbiol.* 28(5), 887-8.
- Thiry, M., Milnes, A. & Brahim, M.B. (2014) Pleistocene cold climate groundwater silicification, Jbel Ghassoul region, Missour Basin, Morocco. *Journal of the Geological Society*, 172, 125-137.
- Tisato N., Torriani S.F.F., Monteux S., Sauro F., De Waele J., Tavagna M.L., D'Angeli I.M., Chailloux D., Renda M., Eglinton T.I., Bontognali T.R.R. (2015) Microbial mediation of complex subterranean mineral structures. *Sci.Rep.* 5.
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M., Vasileva-Tonkova, E. (2013) Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from magura cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, 42(1), 65-76.

- Tourney, J. & Ngwenya, B.T. (2014) The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology. *Chemical Geology*, 386, 115-132.
- Trajano, E. & de Carvalho Marcelo, R. (2017) Towards a biologically meaningful classification of subterranean organisms: A critical analysis of the schiner-racovitza system from a historical perspective, difficulties of its application and implications for conservation. *Subterranean Biology*, 22, 1-26.
- Trajano E., Gallão, JE, Bichuette, ME (2016) Spots of high diversity of troglobites in Brazil: the challenge of measuring subterranean diversity. *Biodiversity and Conservation* 25: 1805–1828. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1151-5>
- Trajano E (2012) Ecological classification of subterranean organisms. In: White WB, Culver DC (Eds) *Encyclopedia of Caves*. Academic Press, Waltham. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00035-9>
- Trollope, D. R. (1975) The preservation of bacteria and fungi on anhydrous silica gel: An assessment of survival over four years. *Journal of Applied Bacteriology*, 38 (2):115-120.
- Twidale, C.R & Vidal Romani, J.R. (2005) *Landforms and Geology of Granite Terrains*. Balkema, The Netherlands.
- Urbani, F. (1976) Opalo, calcedonia y calcita en la cueva del Cerro Autana (Am.11), Territorio Federal Amazonas, Venezuela. *Bol. Soc. Venezolana Espeleol.* 7 (14), 129–145.
- Urbani, F. (2005) Opal-A speleothems of wei-assipu-tepui, Roraima Province, Brazil. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, 21-26.
- Urrutia, M.M. & Beveridge, T.J. (1994) Formation of fine-grained metal and silicate precipitates on a bacterial surface (*Bacillus subtilis*). *Chemical Geology*, 116, 261-280.
- Urzi, C., De Leo, F., Bruno, L. and Albertano, P. (2010) Microbial Diversity in Paleolithic Caves: A Study Case on the Phototrophic Biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microbial ecology*, 60, 116-129.

- Van Cappellen P. (2003) Biomineralization and global biogeochemical cycles (in Biomineralization) Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 54:357-381.
- Van Hengstum, P. J., Reinhardt, E. G., Beddows, P. A., Huang, R. J., & Gabriel, J. J. (2008) Thecamoebians (testate amoebae) and foraminifera from three anchialine cenotes in Mexico: Low salinity (1.5-4.5 psu) faunal transitions. *Journal of Foraminiferal Research*, 38(4), 305-317.
- Vaqueiro, M. & Vidal Romaní, J. R. (2014) Granite pseudokarst. En Schnabel, S. y Gómez Gutiérrez, A. (Eds.) XIII Reunión de la Sociedad Española de geomorfología. (Pp 490-493). Cáceres, España.
- Vaqueiro Rodríguez, M. (2017) Cavidades naturales en rocas magmáticas: las cuevas en rocas plutónicas. Tesis Doctoral, Universidade da Coruña, A Coruña.
- Vaughan M.J., Nelson W., Soderlund C., Maier R.M., Pryor B.M. (2015) Assessing Fungal Community Structure from Mineral Surfaces in Kartchner Caverns Using Multiplexed 454 Pyrosequencing. *Microb.Ecol.* 70(1), 175-187.
- Vernet, J. L. (1975) Les charbons de bois de l'Arma du Nasino et l'évolution de nos forêts méridionales depuis 10000 ans: «Approche géologique des quinze derniers millénaires»; *Bull. soc. lang. géogr.* 8 (3-4).
- Vidal Romani J.R. (2008) Forms and structural fabric in granite rocks. *Cuad. Lab.Xeol.Laxe*, 33, 175-198.
- Vidal Romani, J. R. (1985). El Cuaternario de la provincia de La Coruña. Geomorfología granítica. Modelos elásticos de formación de cavidades. Servicio de publicaciones. Universidad Complutense de Madrid, 283 págs.
- Vidal Romaní J.R., Bourne J.A., Twidale C.R., Campbell E.M. (2003) Siliceous cylindrical speleothems in granitoids in warm semiarid and humid climates. *Zeitschrift für Geomorphologie* 47: 417-437.
- Vidal Romaní, J.R., González López, L., Vaqueiro, M. & Sanjurjo Sánchez, J. (2015) Bioweathering related to groundwater circulation in cavities of magmatic rock

- massifs. *Environmental Earth Sciences*, 73, 2997-3010. DOI: [10.1007/s12665-014-3743-2](https://doi.org/10.1007/s12665-014-3743-2)
- Vidal Romaní J. R. y Gracia Prieto, F. J. (1987) Formación de cavidades en rocas graníticas bajo condiciones no epigénicas. *Cuadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 16, 301-312.
- Vidal Romaní J. R., Ramanohison H., Rabenandrasana S. (1997) Géomorphologie granitique du Massif de l'Andringitra: sa relation avec l'évolution de l'île pendant le Cenozoïque. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 22, 183-208.
- Vidal Romaní, J. R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaqueiro, M., Fernández Mosquera, D. (2010a) Speleothems of Granite Caves. *Comunicações Geológicas*, 97, 71-80.
- Vidal Romaní, J. R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaqueiro, M., Fernández Mosquera, D. (2010b) Speleothem development and biological activity in granite cavities. *Geomorphologie: relief, processus, environment*, 4, 337-346.
- Vidal-Romaní J.R, Sanjurjo Sánchez J., Vaqueiro Rodríguez M., González López L., López Galindo M.J. (2013) Speleothems In Cavities Developed In Magmatic Rocks. In Filippi M., Bosák P. (Eds) *Proceedings of the 16th International Congress of Speleology*, July 21–28, Brno. Vol. 3, p. 479-482. Czech Speleological Society. Praha.
- Vidal Romaní J.R. & Twidale C.R. (1999) Sheet fractures, other stress forms and some engineering implications. *Geomorphology*. 31, 1-4: 13-27.
- Vidal Romaní, J. R. & Vaqueiro, M. (2007) Types of granite cavities and associated speleothems: genesis and evolution. *Nature Conservation*, 63, 41-46.
- Vidal Romaní J. R., Vaqueiro Rodríguez, M., Sanjurjo Sánchez, J. y González López, L. (2014a) Morphologic types of speleothems in magmatic rock caves. En Schnabel, S. y Gómez Gutiérrez, A. (Eds.) *XIII Reunión de la Sociedad Española de Geomorfología*. (Pp 490-493). Cáceres, España.
- Vidal Romaní J. R., Vaqueiro Rodríguez, M., Sanjurjo Sánchez, J. y González López, L. (2014b) Speleothems in magmatic rock caves and associated microorganisms.

En Schnabel, S. y Gómez Gutiérrez, A. (Eds.) XIII Reunión de la Sociedad Española de Geomorfología. (Pp 498-501). Cáceres, España.

Vidal Romaní J. R., Vaqueiro Rodríguez, M., Sanjurjo Sánchez, J. y González López, L. (2014c) Mineralogy of speleothems in magmatic rock caves. En Schnabel, S. y Gómez Gutiérrez, A. (Eds.) XIII Reunión de la Sociedad Española de Geomorfología. (Pp 494-497). Cáceres, España.

Vidal Romaní, J. R. & Twidale, C.R. (1998a) Formas y paisajes graníticos. Servicio de Publicaciones. Universidade da Coruña. 411 pp.

Vidal Romaní, J. R.; Twidale, C. R.; Bourne, J. & Campbell, E.M. (1998b) Espeleotemas y formas constructivas en granitoides. *Actas V Reunión Nacional de Geomorfología*. Granada, España.

Vidal Romaní, J.R. y Vilaplana, J.M. (1983) Datos preliminares para el estudio de espeleotemas en cavidades graníticas. *Cadernos Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 7, 335-323.

Vignaga, E., Haynes, H. & Sloan, W.T. (2012) Quantifying the tensile strength of microbial mats grown over noncohesive sediments. *Biotechnology and bioengineering*, 109, 1155-1164.

Vohník, M., Burdikova, Z., Albrechtova, J. and Vosatka, M. (2009) Testate Amoebae (Arcellinida and Euglyphida) vs. Ericoid Mycorrhizal and DSE Fungi: A Possible Novel Interaction in the Mycorrhizosphere of Ericaceous Plants? *Microbial ecology*, 57, 203-214.

Walochnik, J., & Mulec, J. (2009) Free-living amoebae in carbonate precipitating microhabitats of karst caves and a new vahlkampfiid amoeba, *allovahlkampfia spelaea* gen. nov., sp. nov. *Acta Protozoologica*, 48(1), 25-33.

Watkins, J. J., Behr, h. J. and Behr, K. (2011) Fossil microbes in opal from Lightning Ridge — implications for the formation of opal. *Quarterly Notes. Geological Survey of New Wales*. Australia.

Webb J. A. (1979) Morphology and origin of Holy Jump Lava Cave, south-eastern Queensland. *Helictite* 17, 65-74.

- Webb, J. A., & Finlayson, B. L. (1984) Allophane and opal speleothems from granite caves in south-east Queensland. *Australian Journal of Earth Sciences*, 31(3), 341-349.
- Webb J.A. & Finlayson B. (1987) Incorporation of Al, Mg, and water in opal-A: Evidence from speleothems. *American Mineralogist*, 72, 1204-1210.
- Weiner S., Dove, P.M. (2003) An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev Mineral Geochem* 54:1-29.
- Welch, S. A. & Ullman, W. J. (1996) Feldspar dissolution in acidic and organic solutions: Compositional and pH dependence of dissolution rate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(16), 2939-2948.
- Weliange W.S. & Pathmakumara Jayasinghe (2010) Gneissic speleotherms in Sri Lanka. *National Archaeological Symposium*.
- Weon, H., Anandham, R., Kim, B., Hong, S., Jeon, Y. and Kwon, S. (2009) *Dyella soli* sp. nov. and *Dyella terrae* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1685-1690.
- Westall, P., de Wit, M. J., Dann, I., van der Gaast, S., de Ronde C.E.I., and Gemeke, D. (2000) Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced, shallow water sediments, Barberton greenstone belt, South Africa, Precamb. Res.
- White W.B. (1976) Cave minerals and speleothems. In Ford T.D. & Cullingford C.H.D. (eds.), *The science of speleology*. London, Academic Press, 267-327.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(12), 6578-6583.
- Wilkinson, D.M. & Mitchell, E.A.D. (2010) Testate amoebae and nutrient cycling with particular reference to soils. *Geomicrobiology Journal*, 27, 520-533.
- Wilkinson, D. M., & Smith, H. G. (2006) An initial account of the terrestrial protozoa of ascension island. *Acta Protozoologica*, 45(4), 407-413.

- Willems, L., Compere, Ph., Hatert, F., Puclet, A., Vicat, J.P., Ek, C., Boulvain, F. (2002) Karst in granitic rocks, South Cameron: cave genesis and silica and taranakite speleothems. *Terra Nova* 14, 355–362.
- Windels, C., Burnes, P. and Kommedahl, T. (1993) *Fusarium* Species Stored on Silica Gel and Soil for Ten Years. *Mycologia*, 85, 21-23.
- Woo, K. S., Choi, D. W., & Lee, K. C. (2008) Silicification of cave corals from some lava tube caves in the jeju island, Korea: Implications for speleogenesis and a proxy for paleoenvironmental change during the late quaternary. *Quaternary International*, 176-177(C), 82-95.
- Woyke, T. & Rubin E. M. (2014) Searching for new branches on the tree of life. 6210 (346), 698-699. DOI: [10.1126/science.1258871](https://doi.org/10.1126/science.1258871)
- Wray, R. A. L. (1999) Opal and chalcedony speleothems on quartz sandstones in the Sydney region, southeastern australia. *Australian Journal of Earth Sciences*, 46(4), 623-632.
- Wright, V. P. (1989) Terrestrial stromatolites and laminar calcretes: A review. *Sedimentary Geology*, 65(1-2), 1-13.
- Wylezich, C., Meisterfeld, R., Meisterfeld, S. and Schlegel, M. (2002) Phylogenetic analyses of small subunit ribosomal RNA coding regions reveal a monophyletic lineage of euglyphid testate amoebae (order Euglyphida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 108-118.
- Xu, H., Wang, X., Li, H., Yao, H., Su, J. and Zhu, Y. (2014) Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape. *Environmental Science and Technology*, 48, 9391-9399.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M. and Yokota, A. (2011) *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of *Thermogemmatisporaceae* fam. nov. and *Thermogemmatisporales* ord. nov. within the class Ktedonobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 903-910.

- Youssef, N.H., Couger, M.B., McCully, A.L., Criado, A.E.G., Elshahed, M.S. (2015) Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: A review. *Journal of Advanced Research*. 6(3), 269-282.
- Zapata, J., Yáñez, M., Rudolph, E. (2008) Thecamoebians (protozoa: Rhizopoda) of the peatland from puyehue national park (40°45' S; 72°19' W), Chile. [Tecamobianos (Protozoa: Rhizopoda) de una turbera del Parque Nacional Puyehue (40°45' S; 72°19' W), Chile] *Gayana*, 72(1), 9-17.
- Zeppelini, D., & Christiansen, K. (2003) Arrhopalites (collembola: Arrhopalitidae) in U.S. caves with the description of seven new species. *Journal of Cave and Karst Studies*, 65(1), 36-42.
- Ziegenbalg, S.B., Berthold, C., Kappler, A. and Peckmann, J. (2011) Gypsum whiskers in Messinian evaporites identified by μ -XRD2. *Facies*, 57, 249-253.
- Zhi, X., Li, W. & Stackebrandt, E. (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 589-608.
- Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., & Mo, M. (2007) Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in guizhou province, southwest of china. *Journal of Microbiology*, 45(2), 105-112.

